

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Biofyzikální chemie



Bc. Lukáš Fojtík

Využití radikálového značení proteinů pomocí
Togniho činidel ve strukturní biologii

The use of protein radical footprinting by Togni
reagents in structural biology

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Zdeněk Kukačka, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Petr Novák, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 25. dubna 2020

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli Mgr. Zdeňku Kukačkovi, Ph.D. za zadání zajímavého tématu, poskytnutou podporu, trpělivost a čas, který se mnou strávil při zpracování této diplomové práce.

Dále bych rád poděkoval RNDr. Petru Novákovi Ph.D. za konzultaci výsledků při zpracování experimentální části mé práce a celému týmu laboratoře 163, v BIOCEVU, za přátelskou atmosféru, primárně Mgr. Janu Fialovi. V neposlední řadě děkuji také Grantové agentuře ČR, která předkládaný projekt podpořila (19-16084S)

Také bych rád poděkoval své přítelkyni a své rodině za podporu během celého studia.

Abstrakt

Metody strukturní proteomiky, mezi které se řadí iontová mobilita, chemické zesílení či kovalentní značení, lze zařadit mezi významné metody studia struktury biomolekul. Tyto metody v posledních dekáдах významně přispěly k rozšíření našich znalostí o funkci, dynamice a molekulárních interakcích biomolekul a napomohly tak k pochopení důležitých biologických procesů v buňce. My jsme se rozhodli toto portfolio metod dále rozšířit, a to o přístup využívající fluoralkylové radikály generované Togniho činidly bez nutnosti použít laser. Jako modelové biomolekuly byly zvoleny proteinogenní aminokyseliny, proteiny ubiquitin, a apo- a holoformy myoglobinu. Radikály byly indukovány kyselinou askorbovou a terminovány nadbytkem tryptofanu. Analýza produktů radikálového značení byla prováděna hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením. V případě „Top down“ analýzy byly testovány fragmentační techniky ETD, ECD-CID a v případě „Bottom up“ byly proteiny štěpeny trypsinem a separovány na koloně s obrácenou fází spojenou s hmotnostním spektrometrem. V případě značení aminokyselin byly označeny všechny aromatické aminokyseliny a cystein. Následné mapování přístupnosti proteinového povrchu k rozpouštědlu fluoralkylovým radikálům přineslo strukturní informace, které jsou ve shodě se známou prostorovou strukturou studovaných proteinů.

Klíčová slova: kovalentní značení, radikálové značení, fluoralkylové radikály, hmotnostní spektrometrie, Togniho činidla

Abstract

Structural proteomic methods such as an ion mobility mass spectrometry, chemical cross-linking or covalent labeling have been established as powerful tools for structural studies of biomolecules in general. These methods have significantly contributed to the expansion of our knowledge about biomolecular functions, their dynamics and molecular interactions and therefore led to the understanding of important biological processes occurring in a cell. We decided to spread these methods and we developed a new radical labeling technique relaying on Fluor-alkyl radicals that does not require a laser dissociation of hydrogen peroxide. We exploited the potential of Togni reagents to form Fluor-alkyl radicals by reducing agent under native conditions. The induction of Fluor-alkyl radicals was triggered by ascorbic acid and the labeling pulse was stopped by tryptophan. The modified proteins were analyzed by top down or bottom up approach using high resolution mass spectrometry. In case of top down approach, several fragmentation techniques (CID-ECD, ETD) were tested for protein analysis while in case of bottom up approach the analyzed proteins were digested by trypsin and separated on reverse phase column online coupled to mass spectrometer. As the model biomolecules we chose a 20 proteinogenic amino acids and proteins, ubiquitin, apo- and holomyoglobin. In the case of amino acid analysis, we found the reactive amino acids, the aromatic one and cysteine. For the case of proteins, we successfully labeled both proteins and obtained structural information which was in accordance with other methods of structural biology such as X-ray. Our data lead to assumption that the radical labeling by Fluoro-alkyls could be used as a fast and powerful method to study protein dynamics and complex formation in solution.

Key words: Covalent labeling, radical labeling, Fluor-alkyl radicals, mass spectrometry, Togni reagent's

Seznam zkratek

ACN	Acetonitril
AMK	Aminokyselina
aMb	Apoforma myoglobinu
BDC	<i>N</i> -Benzyl- <i>N</i> '-3-dimethylaminopropylkarbodiimid
CID	Kolizně indukovaná disociace (z angl. collision induced dissociation)
Cys, C	Cystein
Da	Dalton
DHCH-arginin	<i>N</i> ⁷ , <i>N</i> ⁸ -(1,2-Dihydroxycyklohex-1,2-ylen)- <i>L</i> -arginin hydrochlorid
DTT	Dithiotreitol
ECD	Disociace záchytem elektronu (z angl. electron capture dissociation)
EDC	(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid hydrochlorid
ESI	Elektrosprejová ionizace (z angl. Electrospray ionization)
ETD	Disociace přenosem elektronu (z angl. electron transfer dissociation)
FPOP	Rychlá fotochemická oxidace proteinů (z angl. fast photochemical oxidation of proteins)
FT-ICR	Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
GEE	Glycinethylester
H-D výměna	Vodík-deuteriová výměna (z angl. hydrogen-deuterium exchange)
His, H	Histidin
hMb	Holoforma myoglobinu
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. High performance liquid chromatography)
IgG	Imunoglobulin G
IRMPD	Infračervená multifotonová disociace (z angl. infrared multiple photon dissociation)
LC-MS	Kapalinová chromatografie propojená s hmotnostní spektrometrií (z angl. Liquid chromatography – Mass spectrometry)
MALDI	Laserová desorpce a ionizace za účasti matrice (z angl. matrix assisted laser desorption/ionization)
Mb	Myoglobin
MS	Hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)

MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
NaTFMS	Trifluormethansulfinát sodný
NHS	<i>N</i> -Hydroxysukcimid
NMR	Nukleární magnetické rezonance
PD-MS	Hmotnostní spektrometr s plasmovou desorpcí
Phe, F	Fenylalanin
PTM's	Posttranslační modifikace (z angl. Postranslation modification's)
Q-TOF	Kvadrupól s analyzátozem doby letu
T-Ac	Kyselé Togniho činidlo (1-(trifluoromethyl)-1,2-benziodoxol-3(1H)-on)
TBHP	terc-Butylhydroperoxid
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxyl
T-IM-Ac	Imidazolové kyselé Togniho činidlo (1-(imidazol tetrafluoroethyl)-benziodoxol-1-on)
T-IM-OH	Imidazolové alkoholové Togniho činidlo (3,3-dimethyl-1-(imidazol tetrafluoroethyl)-benziodoxol)
T-OH	Alkoholové Togniho činidlo (trifluoromethyl-1,3-dihydro-3,3-dimethyl-1,2-benziodoxol)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp, W	Tryptofan
Tyr, Y	Tyrosin
UBQ	Ubiquitin
UVPD	Ultrafialová disociace (z angl. ultraviolet photodissociation)

Obsah

1	Teoretický úvod.....	10
1.1	Labilní kovalentní značení	11
1.1.1	Vodík-deuteriová výměna	11
1.2	Stabilní kovalentní značení	16
1.2.1	Chemické značení.....	16
1.2.2	Radikálové značení	23
1.3	Togniho činidla.....	32
1.4	Analýza biomolekul pomocí hmotnostní spektrometrie	35
2	Cíle práce.....	38
3	Materiál	39
3.1	Biologický materiál.....	39
3.2	Seznam chemikálií.....	39
3.3	Seznam přístrojů a materiálu	40
3.4	Seznam roztoků	41
3.5	Softwarové vybavení	41
4	Metody	42
4.1	Příprava značícího pufru pro reakci proteinu s Togniho činidly	42
4.2	Radikálové značení aminokyselin s Togniho činidly	42
4.3	LC-MS analýza aminokyselin po radikálovém značení pomocí Togniho činidel	42
4.4	Příprava proteinů pro radikálové značení	42
4.5	Příprava apomyoglobinu	43
4.6	Optimalizace radikálového značení ubiquitinu Togniho činidly.....	43
4.7	MS Analýza proteinů před i po značení Togniho činidly	44
4.8	Fragmentační analýza ubiquitinu hmotnostní spektrometrií (Top-down)	44
4.8.1	ETD.....	44
4.8.2	Kombinace CID-ECD	45
4.9	Optimalizace radikálového značení apo- a holomyoglobinu Togniho činidly.....	45
4.10	Enzymatické štěpení vzorků.....	46
4.11	LC-MS analýza vzorků a/hMb po radikálovém značení Togniho činidly	47
4.12	Vyhodnocení dat.....	48
4.12.1	LC-MS analýza aminokyselin po radikálovém značení Togniho činidly... ..	48
4.12.2	Data pořízená s využitím top-down hmotnostní spektrometrie.....	48
4.12.3	Data pořízená s využitím bottom-up hmotnostní spektrometrie	48

5	Výsledky	49
5.1	Optimalizace přípravy značícího pufru	49
5.2	Analýza aminokyselin po radikálovém značení Togniho činidla	50
5.3	Radikálové značení ubiquitinu Togniho činidly.....	52
5.4	„Top down“ analýza ubiquitinu po radikálovém značení Togniho činidla	53
5.5	Radikálové značení apo- a holoformy myoglobinu.....	56
5.6	Proteolytická analýza a kvantifikace modifikovaných residuí apo- a holoformy myoglobinu	59
5.6.1	Kvantifikace aromatických aminokyselin apo- a holomyoglobinu pro alkoholové činidlo.....	60
5.6.2	Kvantifikace aromatických aminokyselin apo- a holomyoglobinu pro kyselé činidlo	63
5.6.3	Kvantifikace aromatických aminokyselin apo- a holomyoglobinu pro imidazolové alkoholové činidlo.....	66
5.6.4	Kvantifikace aromatických aminokyselin apo- a holomyoglobinu pro imidazolové alkoholové činidlo.....	69
6	Diskuze.....	72
7	Závěr	81
8	Citace	82
9	Přílohy	88

1 Teoretický úvod

Nukleové kyseliny jsou považovány za nositele života a proteiny jsou považovány za jeho pohonné jednotky. Proteiny jsou zodpovědné za řadu velmi důležitých aktivit od katalýz životně důležitých reakcí až po ochranné funkce a přenos informace. K porozumění, jak tyto proteiny pracují, je často nutné znát jejich strukturu, dynamiku a interakční partnery¹. Mezi hlavní techniky studování struktury proteinu jsou považovány rentgenová krystalografie, nukleární magnetická rezonance, kryogenní elektronová mikroskopie a v posledních dekáдах i metody hmotnostní spektrometrie (MS)²⁻⁴. Mezi tyto metody patří vodík-deuteriová výměna (z angl. Hydrogen/Deuterium Exchange, H-D výměna), chemické zesíťení (z angl. Chemical Cross-linking), nativní hmotnostní spektrometrie a iontová mobilní spektrometrie (z angl. Native mass spectrometry and ion mobility spectrometry) a kovalentní značení – „footprinting“ (z angl. Covalent labeling – footprinting)⁵. Pomocí těchto metod MS sice nezískáme detailní informace o jednotlivých atomech zkoumané molekuly, ale můžeme získat přibližné uspořádání biomolekul v prostoru, dynamice, určení pozici vazebných míst pro vazebné partnery a intermolekulární či intramolekulární vzdálenosti, které mohou v kombinaci s in-silico výpočty vést k vyřešení prostorové struktury biomolekuly⁶. V této práci budou podrobněji diskutovány kovalentní metody značení biologických molekul, které lze rozdělit do dvou skupin na stabilní a labilní. Mezi tzv. labilní metody fúzního značení se řadí H-D výměna a stabilní metody značení lze dále dělit na chemické značení a radikálové značení.

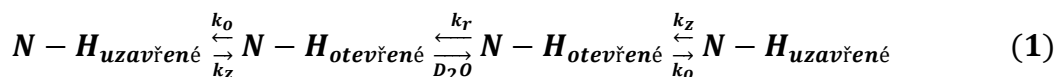
1.1 Labilní kovalentní značení

V případě labilního značení jsou vždy přítomny dva děje. V případě prvního děje dochází k označení biomolekuly, zatímco druhý děj působí proti prvnímu ději a vrací biomolekulu do počátečního stavu. Tyto dva děje probíhají souběžně, aby bylo možné sledovat pouze první děj, je nutné změnou fyzikálně-chemických podmínek omezit děj zpětný. V případě, když je zpětný děj dostatečně zpomalen, je možné sledovat, která část biomolekuly byla označena. Nejznámější metodou labilního značení je vodík-deuteriová výměna.

1.1.1 Vodík-deuteriová výměna

Sekundární struktura proteinů je stabilizována pomocí vodíkových vazeb $N-H\cdots O-H$ mezi jednotlivými páteřními (primárními) řetězci aminokyselin (z angl. backbone chain). Po vložení proteinu do D_2O dochází k výměně vodíku (Protia 1H) za deuterium 2H , což se projeví rozdílem molekulové hmotnosti o jeden neutron a díky tomu je možné změnu monitorovat pomocí hmotnostní spektrometrie⁷. Ačkoliv je metoda H-D výměny spojována v dnešní době zejména s hmotnostní spektrometrií, její základy byly popsány již v polovině minulého století, kdy Linderstrøm-Lang a Hvidt vypracovali metodu pro potvrzení Paulingovy a Coreyho predikce, že vodíkové vazby jsou zodpovědné za tvorbu α -helixu a β -skládaného listu^{8,9}. K důkazu existence vodíkových vazeb byl použit protein insulin, který byl rozpuštěn v 99,6% oxidu deuteria a následně byly v různých časových intervalech odebrány vzorky, které vzápětí byly zmrazeny. Poté byly vzorky lyofilizovány v přítomnosti oxidu fosforečného za sníženého tlaku. Po lyofilizaci byly vzorky rozpuštěny ve vodě a byl stanoven obsah deuteria na základě rozdílných hustot čisté a deuteriové vody⁹.

Linderstrøm-Lang a Hvidt na základě svého experimentu popsali první mechanismy a kinetiky H-D výměny. Mechanismus průběhu H-D výměny je popsán reakcí (1)¹⁰.

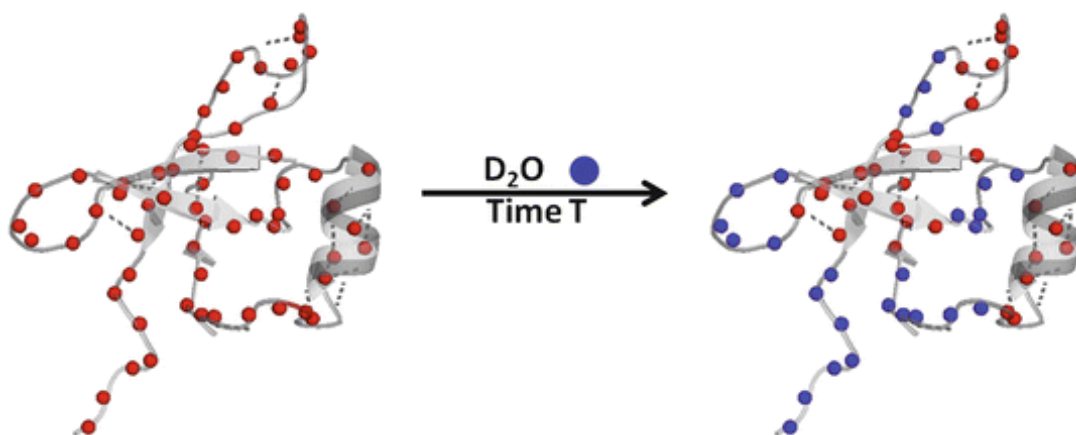


Mechanismus popisuje fluktuaci mezi částmi, které jsou uzavřené k_z (výměně nepřístupné) oproti částem, které jsou otevřené k_o (výměně přístupné). Jakmile se dosáhne otevřeného stavu, potom deuterace probíhá podle konstanty k_r ¹¹. K výměně vodíků za deuteria v biomolekulách může dojít pomocí tří typů mechanismů katalýzy. Jedná se o tzv. kyselou katalýzu (katalýza protonem), kdy je rychlost katalýzy dána druhým řádem k_{H^+} . Druhým možným mechanismem je katalýza pomocí hydroxidového aniontu tedy k_{OH^-} a posledním

typem katalýzy je katalýza pomocí molekul vody k_{H_2O} . Obě tyto katalýzy probíhají analogicky jako kyselá katalýza, ale příspěvek výměny katalyzované pouze molekulami vody je oproti příspěvku kyselé a bazické katalýzy zanedbatelný a probíhá neustále za jakýchkoli podmínek. Výsledná kinetika k_r je dána za příspěvku všech katalýz a je znázorněná rovnicí (2)¹².

$$k_r = k_{H^+} + k_{OH^-} + k_{H_2O} \quad (2)$$

Linderstrøm-Lang a Hvidt zjistili, že kinetika množství vyměněných vodíků je závislá na teplotě a také popsali jev, kdy dochází k tzv. zpětné výměně (z angl. back exchange) deuteria za vodík v přítomnosti vzdušné vlhkosti¹³. K míře deuterace mohou přispívat až 3 typy vodíků. Nejvíce zaznamenáváme tzv. amidické vodíky, tyto vodíky se vyskytují na atomu dusíku peptidové vazby. Druhým typem jsou vodíky, které jsou kovalentně vázané k uhlíku, tyto vodíky se do výměny prakticky nezapojí a jejich detekce je velmi vzácná. Posledním typem vodíků, jsou vodíky na postranních řetězcích každé aminokyseliny (vyjma vodíků vázaných na uhlících), ty jsou z hlediska výměny velmi reaktivní a dochází k jejich výměně téměř okamžitě. Tyto vodíky ovšem podléhají téměř okamžitě výše zmiňované zpětné výměně deuteria za vodík a je obtížné tuto změnu detekovat, proto jsou pro nás z hlediska výměny nejdůležitější vodíky amidické, s výjimkou prolinu, který amidickou skupinu nemá^{7,10}. Amidické vodíky jsou zodpovědné za tvorbu vodíkových vazeb při vzniku sekundární struktury, vznik vodíkové vazby rapidně ovlivňuje rychlost výměny. Pokud se vodíky podílejí na tvorbě vodíkových vazeb, dochází k jejich výměně výrazně pomaleji než vodíky, které se nepodílejí na jejich vzniku, a tedy nejsou součástí strukturované části proteinu. Míra deuterace je dále ovlivněna přístupností a reaktivitou rozpouštědla k proteinu - hydrofobní jádro a části proteinu, které jsou například ukotveny v membráně deuteraci téměř nepodléhají^{7,14}. Schéma deuterace je znázorněno na obrázku 1 str. 13.



Obrázek 1: Schématické znázornění míry deuterace proteinu v závislosti na výskytu vodíku ve strukturovaných versus nestrukturovaných částech proteinů a míry deuterace v závislosti na přístupnosti rozpouštědla. Převzato a upraveno z¹⁴. Červené tečky znázorňují vodíky (Protium) a modré tečky znázorňují deuterium. Nejnižší míra deuterace je v hydrofobním jádře proteinu a dále ve strukturovaných částech jako je α -helix na obrázku napravo a β -otáčka na obrázku nahoře. Zbytek proteinu je přístupný k rozpouštědлу nebo není strukturovaný a dochází zde k výměně vodíku za deuteria ve vyšší míře (modré tečky).

Závislost rychlosti H-D výměny na teplotě, kterou popsali Linderstrøm-Lang a Hvidt, je znázorněna pro modelový polyalaninový peptid při teplotě 20 °C rovnicí (3)¹².

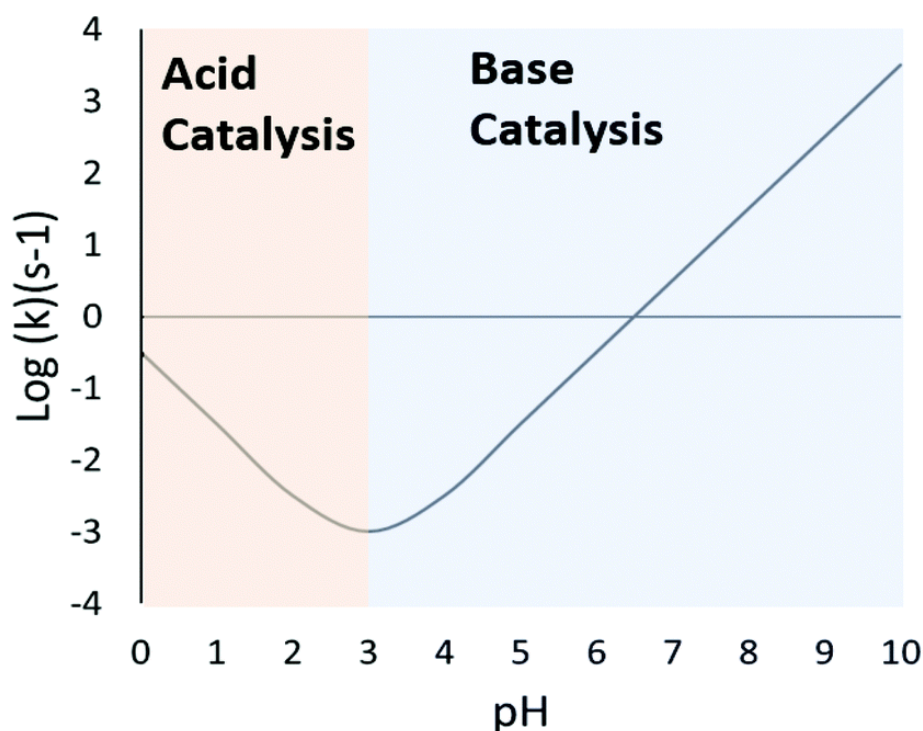
$$k_r(T) = k_r(293)e^{\frac{-E_A[\frac{1}{T}-\frac{1}{293}]}{R}} \quad (3)$$

kde, k_r je celková rychlost H-D výměny, R – univerzální plynová konstanta, E_A – aktivační energie reakce a T je teplota, při které probíhá H-D výměna. Pro kyselou katalýzu E_A nabývá hodnoty 14 kcal/mol, pro bazickou 17 kcal/mol a pro katalýzu pomocí vody 19 kcal/mol. Po dosazení do rovnice zjistíme, že pokud snížíme teplotu o 10 °C, ovlivníme rychlost H-D výměny cca 2,8krát. Z tohoto důvodu se prudkého ochlazení využívá pro razantní zpomalení H-D výměny a tím tedy i výměny zpětné¹².

Rychlost výměny lze dále regulovat pomocí změny pH, což je velmi výhodné pro experimentální provedení. Rovnice popisující závislost rychlosti výměny na pH je znázorněna níže (4)¹².

$$k_r = k_{H^+} + 10^{-pD} + k_{OH^-} 10^{(pD-pK_D)} + k_{H_2O} \quad (4)$$

kde, k_r je celková rychlost H-D výměny, konstanty k_{H^+} , k_{OH^-} , k_{H_2O} jsou příspěvky jednotlivých katalýz H-D výměny, diskutované v rovnici (2), pD je korekce pH pro D_2O pufr, kde hodnota pD je o 0,4 vyšší hodnota pH ^{12,15}. Závislost (4) je možné graficky znázornit, když vyneseme logaritmus celkové rychlostní konstanty na pH (Graf 1), z výsledné závislosti grafu lze odečíst, že při hodnotě pH 3 je rychlost H-D výměny nejnižší¹².

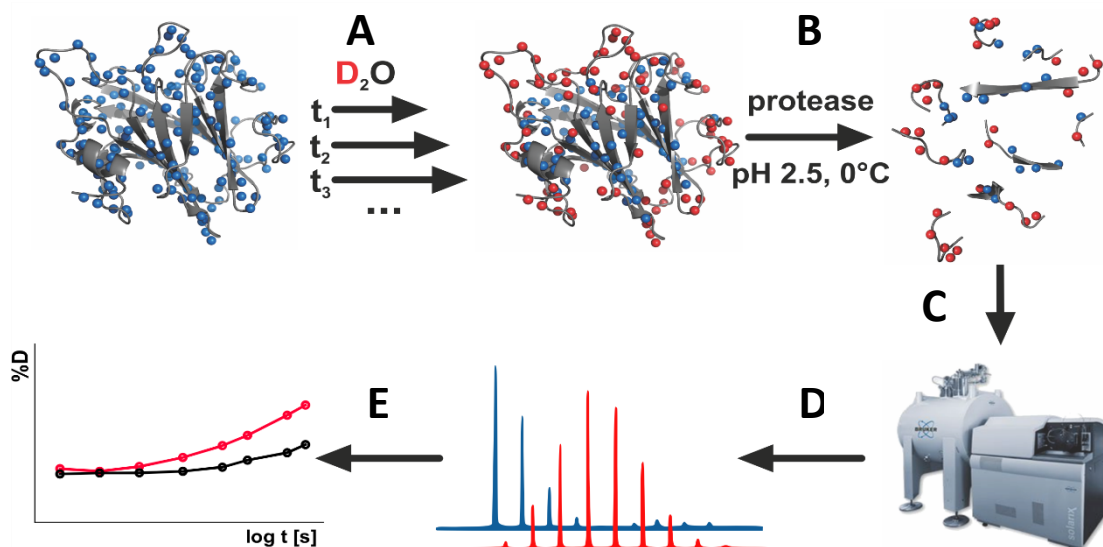


Graf 1: Závislost logaritmu rychlostní konstanty H-D výměny na hodnotě pH . Převzato z¹⁶. Z grafu vyplývá, že nejnižší rychlost H-D výměny je při pH 3, pokud bude pH nižší, bude docházet ke kyselé katalýze a rychlost se bude zvyšovat, stejný trend nastane i při zvyšování pH , kdy ovšem dochází ke katalýze bazické.

Z grafu dále vyplývá, že optimální pH pro provádění H-D výměny je za podmínek bazické katalýzy v oblasti pH 7-9, a to z důvodů optimální rychlosti a také přirozeného prostředí proteinů. Dále lze z grafu vyčíst, že nárůst pH zhruba o jednu jednotku pH způsobí nárůst rychlosti H-D výměny cca 10x. Tohoto jevu se dále využívá pro zastavení reakce okyselením vzorků na pH 2-3, čímž dojde k výraznému zpomalení H-D výměny^{7,16}.

V dnešní době se H-D výměna nejčastěji spojuje s hmotnostní spektrometrií, ale dříve byla hojně používána v kombinaci s nukleární magnetickou rezonancí. Schéma experimentu H-D výměny spojené s hmotnostní spektrometrií můžeme rozdělit na několik částí. První částí experimentu je značení proteinu pomocí těžké vody za různých experimentálních podmínek a následné zhášení (zpomalení H-D výměny) okyselením a

prudkým ochlazením¹⁰. Poté následuje enzymatické štěpení nejčastěji pomocí aspartátových proteas, které jsou schopny štěpit za kyselého pH. Mezi nejpoužívanější proteasy se řadí pepsin, rhizopuspepsin a aspergillopepsin^{17,18}. Proteasy jsou často imobilizovány na hydrofobní nosiče a štěpení probíhá za teploty 0 °C, aby se předešlo možné zpětné výměně¹⁹. Poté následuje separace peptidů pomocí kapalinové chromatografie na obrácené fázi a analýza pomocí hmotnostní spektrometrie. Finálním krokem je pak interpretace dat^{5,7}. Schéma celého experimentu je znázorněno na obrázku 2.



Obrázek 2: Schématické znázornění experimentu H-D výměny propojenou s hmotnostní spektrometrií. Převzato z²⁰. A – značení pomocí D₂O, B – proteolytické štěpení, C – separace pomocí kapalinové chromatografie, D – měření pomocí MS, E – finální interpretace dat.

1.2 Stabilní kovalentní značení

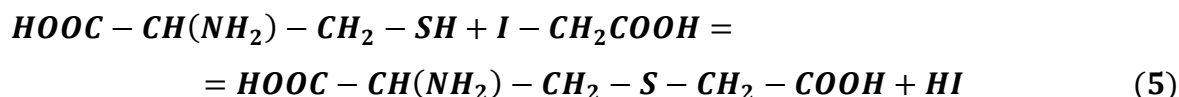
V případě stabilního značení získáme strukturní informaci pouze o okolí jednotlivých aminokyselin, které jsme schopni modifikovat. Pomocí různých chemických a radikálových značek, jsme schopni označit různé aminokyseliny a získáme tak specifickou informaci. Jednou z hlavních podmínek úspěšného značení je přístupnost rozpouštědla a reaktivita k dané aminokyselině. Pokud bude aminokyselina například v hydrofobním jádru, pak se daná aminokyselina nebude modifikovat. Další z podmínek je, že daná reakce, která způsobí modifikace dané aminokyseliny, musí být realizovatelná v nativních podmínkách zkoumaného proteinu^{5,21,22}. Stabilní značení je možné dále rozdělit na značení chemické a radikálové.

1.2.1 Chemické značení

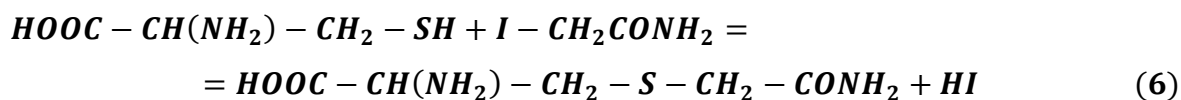
V případě chemického značení bylo dosud publikováno značení pomocí různých chemických látek následujících aminokyselin: cystein, lysin, arginin, tyrosin, kyseliny glutamová a asparagová.

1.2.1.1 Cystein

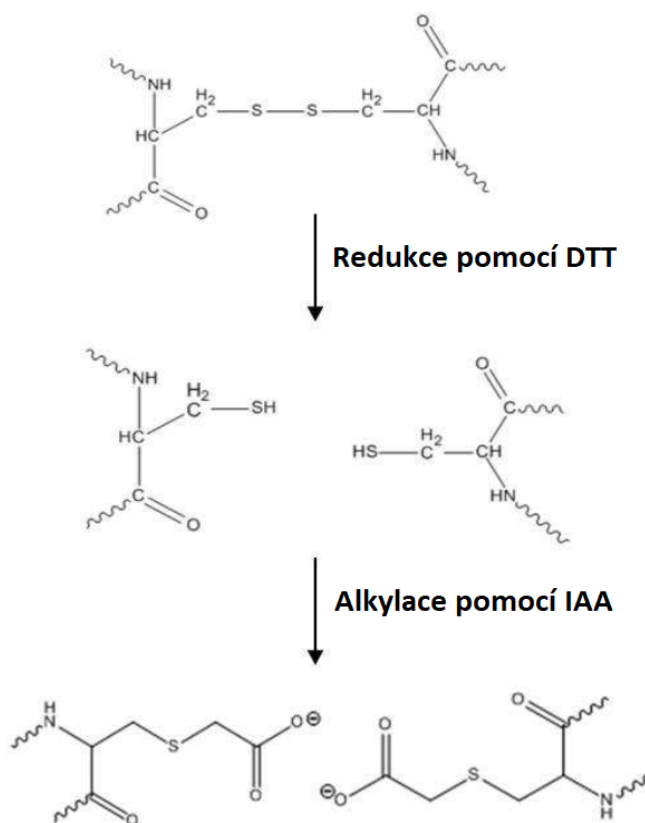
Modifikace cysteinu pomocí jodacetátu byla popsána v roce 1933 Franken Dickensem²³, který zkoumal vliv halogen octových kyselin na glutathion a cystein. Při reakci jodacetátu s glutathionem byly výtěžky reakce téměř zanedbatelné, ale při reakci cysteinu byl výtěžek 85 %. Cystein-hydrochlorid byl neutralizován pomocí hydroxidu barnatého a pak byla přidána jodoctová kyselina v poměru 1:1. Následně byla reakce neutralizována pomocí hydroxidu barnatého a isopropylalkoholu, v dalším kroku byla reakce ponechána přes noc. Poté byl přidán ethanol pro vysrážení barya a chloridu barnatého a po centrifugaci byl odebrán supernatant isopropanolu a vysrážené soli barya byly rozpuštěny ve vodě s kyselinou sírovou. Následně byla odebrána čistá bezbarvá frakce, která byla vysušena ve vakuu pomocí oxidu fosforečného. Zbylý objem byl podroben krystalizaci s výtěžkem cca 85 %. Výsledná reakce experimentu je znázorněna rovnicí (5)²³.



V dnešní době se pro alkylaci cysteinů využívá spíše jodacetamid, který reaguje bohužel i s amidoskupinou, ale tato reakce je velmi pomalá a projeví se až v dlouhých časových intervalech²⁴. Reakce jodacetamidu s cysteinem je znázorněna rovnicí (6 str. 17)²⁴



Této reakce se velmi využívá při redukci a následné alkylaci disulfidických můstků před proteolytickým štěpením²⁵. Schéma redukce a alkylace je znázorněna na obrázku 3.

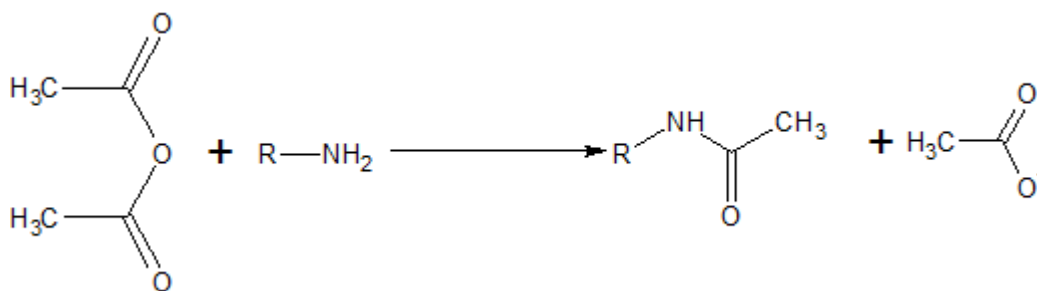


Obrázek 3: Schématické znázornění redukce a alkylace disulfidických můstků. Převzato z²⁵. V prvním kroku dochází k redukci disulfidických můstků pomocí DTT – 1,4-dithiothreitol (30 minut reakce) a následně dochází k alkylaci pomocí IAA – jodoctové kyseliny (15 minut redukce + 15 minut alkylace).

1.2.1.2 Lysin

Aminová skupina v postranním řetězci lysinu podléhá jedné z nejčastějších chemických modifikací, kterou je acetylace. Acetylace je v organismu běžně způsobená pomocí acetyl-CoA, ale je možné acetylace provést i v laboratoři pomocí různých činidel, z nichž první použitý je acetanhydrid, který použil v roce 1959 Fraenkel-Conrat²¹. Ten přidával k proteinu za stálého míchání na chlazené lázni o teplotě 0 °C acetanhydrid. Po jedné hodině byl acetylovaný protein izolován pomocí dialýzy a gelové filtrace. Nevýhodou

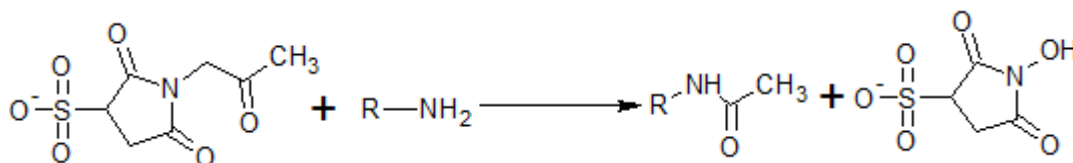
této metody je, že při přílišné saturaci proteinu acetanhydridem může dojít k denaturaci proteinu^{21,26}. Rovnice znázorňující průběh acetylce lysinu je znázorněna na obrázku 4.



Obrázek 4: Schématické znázornění průběhu acetylce amino skupiny pomocí acetanhydridu.
Převzato z²⁷.

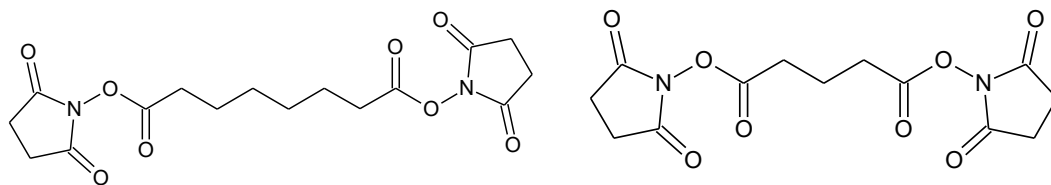
Na tuto práci navázala skupina profesora Przybylského článkem, v kterém poprvé využili acetylaci lysinových zbytků k mapování přístupnosti povrchu proteinu rozpouštědly²².

Další významnou chemickou modifikací amino skupiny je modifikace pomocí N-hydroxysulfosukcinimid esteru kyseliny octové (Sulfo-NHS). Tento ester je velmi reaktivní při pH 7-9. Je dobře rozpustný ve vodě, takže je možné ho přidat přímo ke vzorku proteinu. Alkylaci pomocí Sulfo-NHS není možné provádět v Tris-glycinových a imidazolových pufrch. Po reakci již není možné odblokovat aminoskupiny, kde je acetylová skupina navázána a dochází k porušení nativní struktury proteinu. Z toho důvodů se tyto modifikace používaly i v organické syntéze při blokaci peptidů²⁸. Schéma reakce je znázorněné na obrázku 5.

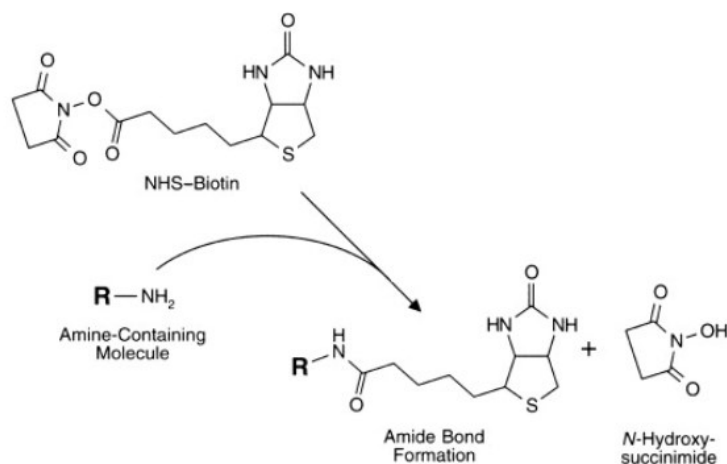


Obrázek 5: Schématické znázornění průběhu acetylce amino skupiny pomocí sulfo-NHS.
Převzato z²⁷.

Pomocí NHS lze zavést i jiné značky na aminovou skupinu, například biotin. Tohoto značení se využívá při izolaci proteinů, kdy na základě afinity biotinu k streptavidinu je možné oddělit protein ze směsi jiných proteinů (princip afinitní chromatografie)²⁹. Schéma reakce je na obrázku 7 str. 19. Dalším možným využitím NHS, jsou tzv. lysinová síťovací činidla, která se používají pro zjištění vzdálenosti mezi jednotlivými aminovými skupinami²⁷. Příklady síťovacích činidel jsou znázorněny na obrázku 6 str. 19.



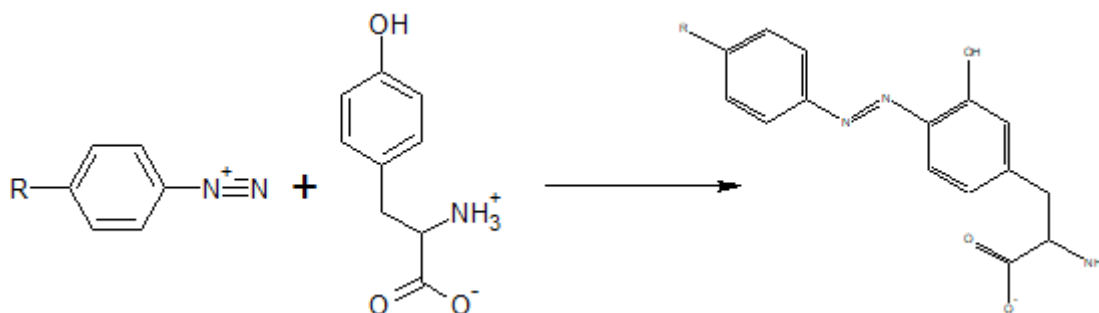
Obrázek 6: Příklad síťovacích činidel DSS (disukcinimidyl suberat) a DSG. Převzato z²⁷.



Obrázek 7: Schématické znázornění průběhu reakce navázání biotinu na aminovou skupinu proteinu za asistence N-hydroxysulfosukcinimidu. Převzato z²⁷.

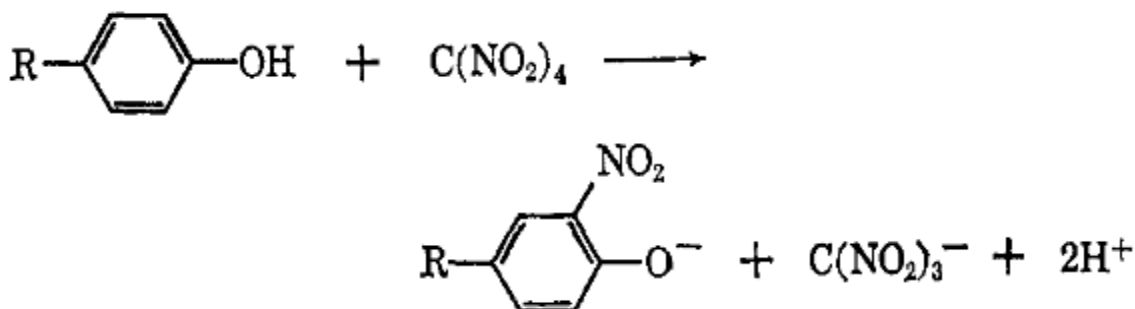
1.2.1.3 Tyrosin

Aminokyselina tyrosin může být v proteinech také acetylována pomocí acetanhydridu, ale nejedná se o N-acetylaci ale O-acetylaci³⁰. Tato reakce je mnohem pomalejší a při nízké koncentraci acetátu v pufru, dochází ke zpětné reakci a vzniku acetanhydridu²⁷. Další možnost, jak modifikovat tyrosin, je pomocí diazoniových derivátů. Diazoniová skupina reaguje s hydroxylovou skupinou aromátů za vzniku kovalentní vazby. Diazonium je velmi reaktivní a téměř okamžitě reaguje s hydroxylovou skupinou při pH 8-10. Mechanismus reakce probíhá podle elektrofilního útoku na aromatickém kruhu, kde u tyrosinu probíhá reakce pouze do pozice ortho. Diazoniové sole mohou být také použity jako síťovací činidla a jejich reakce mají charakteristické zbarvení od hnědé až do černé barvy. Všechny diazoniové modifikace mohou být reverzibilně odstraněny po přidání 0,1M dithionitu sodného v borátu sodném o pH 9^{27,31}. Reakce tyrosinu s diazoniem je znázorněna na obrázku 8 str. 20.



Obrázek 8: Schématické znázornění průběhu reakce diazonia s tyrosinem. Převzato z²⁷.

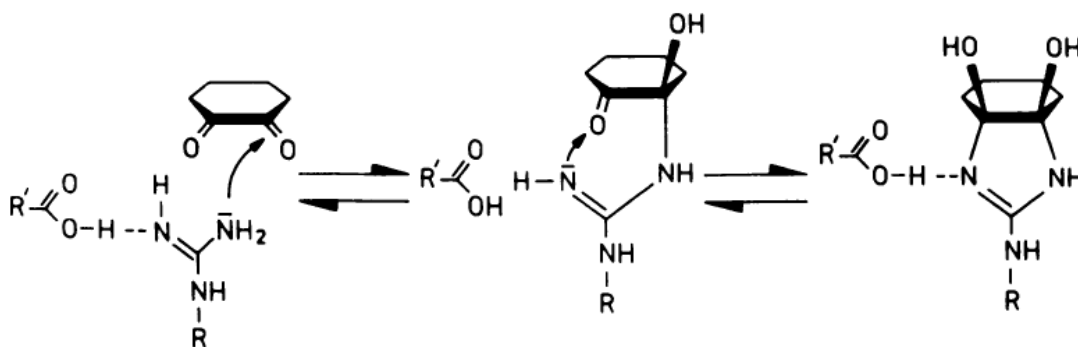
Další modifikace nitrace tyrosinu pomocí tetranitromethanu byla popsána v roce 1966 J.F.Riordanem³². K tyrosinu rozpuštěném v 5mM Tris-HCl, pH 8 byl přidán 42 μ mol tetraaminomethanu a reakce probíhala po dobu jedné hodiny při laboratorní teplotě. Následně byla změřena absorbance při vzorku při 428 nm, která je specifická pro nitrované sloučeniny fenolu a tím byla potvrzena nitrace tyrosinu³². Tato reakce je specifická pouze pro fenoly³³. Reakce tyrosinu s tetranitromethanem je znázorněna na obrázku 9.



Obrázek 9: Schématické znázornění průběhu reakce tetranitromethanu s tyrosinem za vzniku 3-nitro tyrosinu. Převzato z³².

1.2.1.4 Arginin

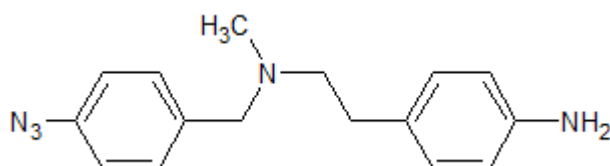
Modifikaci argininu pomocí 1,2-cyklohexandionu poprvé provedl v roce 1974 Laszlo Patthy³⁴, který vložil 1 g L-arginin-HCl spolu s 0,67 g 1,2-cyklohexandionu do 100 ml 0,2M borátu sodného při pH 9 za laboratorní teploty. Reakce byla ponechána 24 hodin pod dusíkovou atmosférou. Po 24 hodinách byla reakce zkoncentrována do 20 ml evaporací pomocí HCl při pH 3. Výsledná frakce byla odsolena pomocí gelové permeační chromatografie a analyzována pomocí papírové chromatografie a vysokonapěťové elektroforézy. Frakce, které obsahovaly čistý DHCH-arginin (*N*⁷,*N*⁸-(1,2-Dihydroxy-cyklohex-1,2-ylen)-L-arginin hydrochlorid), byly skladovány při -20 °C³⁴. Jednalo se o první specifickou modifikaci argininu. Reakce je znázorněna na obrázku 10 str. 21.



Obrázek 10: Schématické znázornění mechanismu reakce L-argininu hydrochloridu s 1,2-cyklohexandionem za vzniku DHCH-argininu. Převzato z²². Reakční mechanismus popisující vznik DHCH-argininu, který byl katalyzován akceptorem protonu, kde R' je zbytek akceptoru protonu a R-zbytek argininu.

Na tuto práci navázala o několik let později laboratoř Michaela Przybylského, kde byl použit 1,2-cyklohexandion pro modifikaci lysosymu ze slepičích vajec (dále jako lysosym). K 80 μg lysosymu v 40 μl 0,2 M borátu sodného byl přidán 100 molární nadbytek 1,2-cyklohexandionu a reakce byla ponechána 120 minut při 37 °C. Reakce byla zastavena rychlým ochlazením na 0 °C a bylo přidáno 5 μl 50% kyseliny octové a analyzováno pomocí PDMS (Hmotnostní spektrometr s plasmovou desorpcí)²². Pomocí peptidového mapování tryptických štěpů bylo ověřeno, že argininy na pozici 5 a 125 jsou nejvíce modifikované, z důvodu jednoduššího přístupu akceptorového katalyzátoru²².

Arginin je možné také modifikovat pomocí fotoafinitních sond. Tento proces byl popsán v roce 1999 Leposavou Antonovičovou³⁵, která použila fotoafinitní sondu odvozenou od diazoniových solí k označení cytochromu 2B4. Fotoafinitní sonda je znázorněna na obrázku 11.



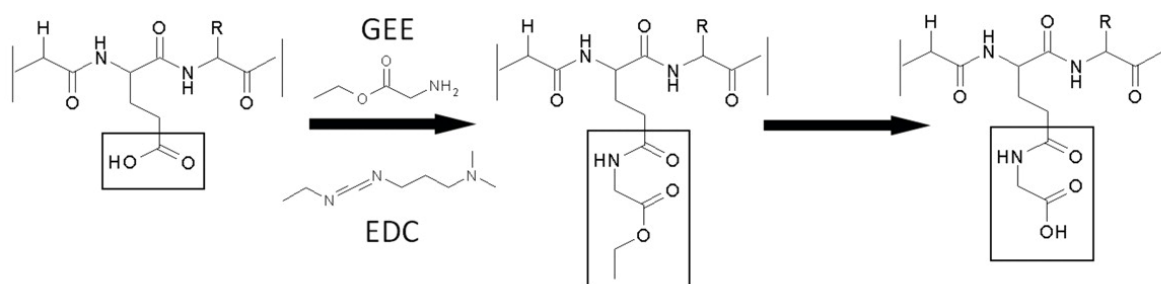
Obrázek 11: Chemická struktura *N*-(*p*-azidobenzyl)-*N*-methyl-*p*-aminofenethylamine. Převzato z³⁵. Fotoafinitní sonda použitá pro značení argininu.

Značení bylo prováděno v 4 mm křemenných kapilárách za laboratorní teploty pomocí fotolyzeru. Roztok 10mM Tris-HCl pufru, pH 7,2 s 4 nmol CYP 2B4 a 25 μM fotoafinitní sondou byl v kapiláře fotolyzován 20 s za laboratorní teploty. Po skončení fotolýzy byl přidán glutathion o koncentraci 12,5 $\mu\text{mol/ml}$. Vzorek byl přečištěn na 10%

elektroforetickém gelu. Výsledný pruh na elektroforetickém gelu patřící proteinu s fotoafinitní sondou byl vyříznut, proteolyticky rozštěpen a analyzován pomocí MALDI-MS. Fragmentační analýza vzniklých peptidů potvrdila přítomnost modifikace argininu³⁵.

1.2.1.5 Kyselina glutamová a kyselina asparagová

Obě tyto aminokyseliny mají ve svém postranním řetězci karboxylovou skupinu, díky čemu je možné tyto dvě aminokyseliny modifikovat. K modifikaci karboxylových skupin biomolekul se nejčastěji používají karbamidy. První modifikaci karboxylové skupiny proteinu pomocí karbamidu provedl D. G. Hoare a D. E. Koshland Jr.³⁶ v roce 1966, kdy použili proteiny lysosym, chymotrypsin a trypsin o koncentraci 10 mg/ml v 1M glycinovém pufru o pH 4,5, do kterého bylo přidáno 0,1M N-benzyl-N'-3-dimethylaminopropylkarbodiimid (BDC) při teplotě 25 °C. Experiment byl prováděn po dobu 5 minut, 60 minut a 5 hodin. Poté byla reakce zastavena 1M acetátovým pufrem a dialyzována³⁶. Výhoda kyselin glutamové a asparagové spočívá v tom, že se v proteinech většinou vyskytují na povrchu mimo hydrofobní jádra. Díky této skutečnosti je vhodné je sledovat při „footprintingu“ (kovaletním značením)³⁶. V roce 2014 použila Parminder Kaur karboimidaci karboxylu za asistence glycinethylesteru (GEE) k analýze struktury monoklonálních protilátek (IgG – Imunoglobulin G). Výsledné modifikace byly analyzovány pomocí LC-MS³⁷. Schéma reakce karbodiimidu za asistence GEE s karboxylem je znázorněna na obrázku 12.



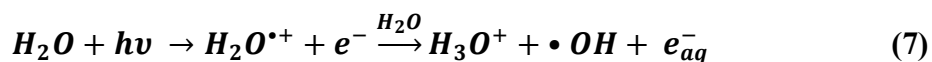
Obrázek 12: Stručné schéma průběhu reakce karbodiimidu (EDC) za asistence GEE s karboxylovou skupinou (karboxylový „footprinting“). Převzato z³⁷. V prvním kroku je karboxylová kyselina aktivována pomocí EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid) a následně je meziprodukt nahrazen GEE (glycin ethyl ester), v posledním kroku dochází k částečnému rozpadu karboxylové modifikace a vzniku OH skupiny na jejím konci.

1.2.2 Radikálové značení

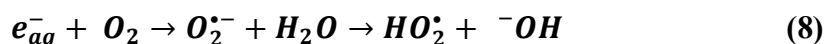
Všechny výše uvedené metody chemických modifikací (v praxi jich existuje mnohem více) je možné použít pro „footprinting“ (kovalentní značení) biologických molekul. V poslední době se však od těchto metod pomalu upouští a daleko více se z důvodu lepšího prostorového rozlišení využívají metody radikálového značení. Dodnes byly popsány metody využívající hydroxylové radikály, karbenové radikály, jodidové radikály a trifluormethylové radikály. V následující kapitole tyto metody charakterizují a podrobněji se pak budu věnovat CF_3 radikálům a jiným radikálům obsahujícím fluor, které byly zvoleny jako předmět vývoje metody, které se věnuje tato předkládaná práce.

1.2.2.1 Hydroxylové radikály

Hydroxylové radikály jsou dostatečně malé a velmi reaktivní, díky čemuž mají velmi široké využití v strukturní biologii při „footprintingu“ (kovalentní značení) proteinů, nukleových kyselin a komplexů proteinů s nukleovou kyselinou³⁸. Tvorba hydroxylových radikálů pomocí fotochemických procesů byla popsána v roce 1999 Markem R. Chancem a Simin D. Malekniou, kteří pomocí rentgenového synchrotronového záření radiolyticky vytvořili hydroxylový radikál z vody³⁸. Tento proces je popsán rovnicí (7).

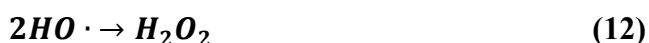
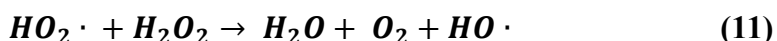
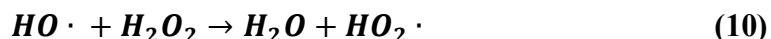


V první fázi reakce vznikají velmi reaktivní protony, které v řádu pikosekund reagují s vodou a vznikají hydroxylové radikály a oxoniové kationty. Pokud reakce probíhá za přístupu vzduchu, dochází k dalšímu kroku reakce a to k reakci elektronu s kyslíkem, kde vzniká jako meziprodukt superoxid, který reakcí s molekulou vody přechází na hydroxylový anion³⁸. Tento proces je popsán rovnicí (8).



První zmínky o využití fotochemického procesu pro tvorbu hydroxylových radikálů a jejich následné využití pro značení (oxidaci) proteinů, byly popsány v roce 2004 skupinou prof. Hetticha, kteří umístili protein do 5M roztoku peroxidu vodíku a následně na něj bylo aplikováno UV záření o vlnové délce 254 nm^{39,40}. Oxidace proteinů pomocí UV záření probíhá velmi rychle a je časově srovnatelná se sbalováním/rozbalováním proteinů a umožňuje tento proces sledovat^{41,42}.

Rychlá fotochemická oxidace proteinů (Fast photochemical oxidation of proteins - FPOP) je založena na fotochemické tvorbě hydroxylových radikálů z peroxidu vodíku pomocí excimerového laseru^{43,44}. Při generaci hydroxylových radikálů excimerovým laserem nedochází pouze k tvorbě hydroxylového radikálu a jeho následné reakci s proteinem, ale i k dalším spontánním reakcím (viz rovnice 9 - 12).



Rovnice (9-12) popisují celý cyklus reakce od generace radikálu (iniciace radikálové reakce) až ke vzniku stabilních produktů ve formě označeného proteinu (není znázorněno) nebo opět peroxidu vodíku (terminace radikálové reakce)⁴⁵. Pomocí hydroxylových radikálů je možné označit téměř všechny aminokyseliny. Poměrně nereaktivní vůči hydroxylovým radikálům jsou aminokyseliny glutamin, kyseliny glutamová a asparagová, asparagin, alanin a glycin⁴³.

Kinetika reakcí, které probíhají při rychlém fotochemickém značení proteinů (FPOP) lze popsat pomocí rovnic, které shrnují základní pojmy a závislosti. Koncentraci nemodifikovaných postranních řetězců X_U po FPOP lze vyjádřit rovnicí (13).

$$[X_U] = [X_U]_0 \cdot \exp(-g_{ox}) \quad (13)$$

kde,

$$g_{ox} = \alpha f_{ox}$$

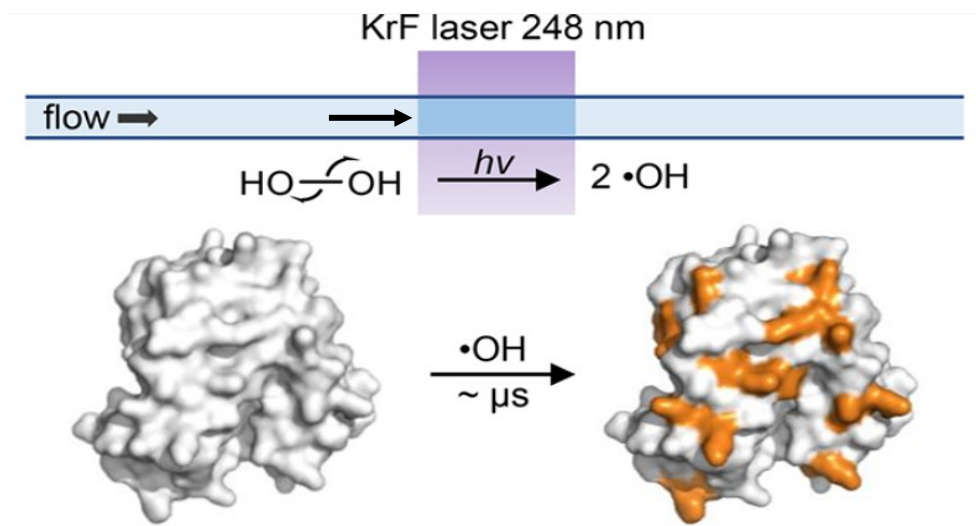
α je tzv. faktor dostupnosti rozpouštědla, který definuje, jak moc se rozpouštědlo dostane k postranním řetězcům. Tento faktor je charakteristikou dané struktury a popisuje, jak moc dochází k oxidativnímu značení. Pokud jsou řetězce zcela nedostupné je α roven nule. Pokud jsou řetězce zcela přístupné, potom je g_{ox} rovno f_{ox} , které je definováno rovnicí (14).

$$f_{ox} = k_{int} [\cdot OH]_0 \tau \quad (14)$$

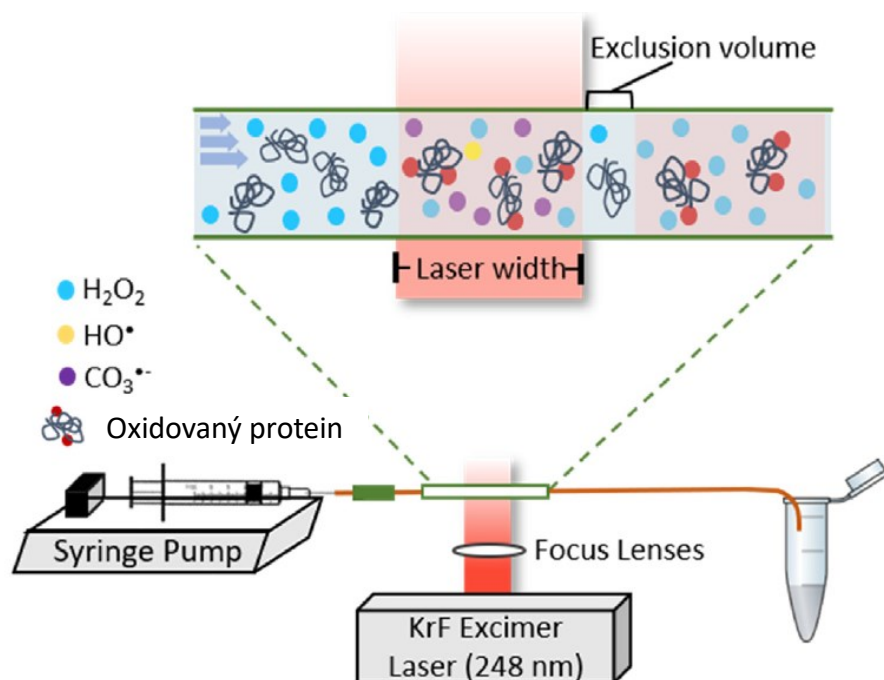
Kde, k_{int} je rychlostní konstanta, která reflektuje skutečnou reaktivitu nemodifikovaných postranních řetězců X_U . $[\cdot OH]$ je skutečná koncentrace hydroxylových radikálů, které vzniknou jedním pulsem a τ je doba života hydroxylového radikálu. f_{ox} je faktor, který

popisuje závislost na vnitřních podmínkách (elektrostatické interakce, Van der Waalsovy síly, hydrofobní efekt atd.) a jejich závislost na různých vnějších podmínkách jako pH, teplota a vliv rozpouštědla. Všechny studie, které se zabývají sbalováním a rozbalováním proteinů, musí počítat s tím, že oba tyto termíny jsou závislé na rozpouštědle, ve kterém se proteiny vyskytují⁴⁶.

Základem této metody je excimerový laser. Excimerový laser byl vynalezen v roce 1970 N. Basovem, který používal xenonový dimer excitovaných elektronů o vlnové délce 172 nm. Z toho vyplývá i název excimerový laser (excimer = excitovaný dimer). Excimerový laser je zpravidla složen ze vzácného plynu a reaktivního plynu (F nebo Cl). Pod elektrickým napětím a při vysokém tlaku dochází ke vzniku excimeru, který může existovat pouze v excitovaném stavu o vlnové délce v ultrafialové oblasti⁴⁷. Vlnová délka 248 nm byla vybrána z několika důvodů. Od 280 nm do 260 nm absorbují postranní řetězce a od 220 – 190 nm absorbuje peptidová vazba. Nad 280 nm již dochází k absorpci peroxidu vodíku a pod vlnovou délkou 190 nm již absorbuje voda. Frekvence laseru musí být také přesně definovaná. Při velmi rychlých pulzech by docházelo k opětovné reoxidaci, a tím k přemodifikování proteinů, což by mělo za následek vznik falešně pozitivních modifikací a narušení struktury proteinů⁴³. Zjednodušené schéma experimentu je znázorněno na obrázku 13 str. 25 a 14 str. 26.



Obrázek 13: Stručné schéma reakce hydroxylových radikálů vzniklé pomocí metody FPOP s molekulou proteinu. Převzato a upraveno z⁴⁵. Směs proteinu s peroxidem vodíku je přiváděna o daném průtoku kapilárou, na kterou je zacílen excimerový laser, přičemž dochází ke generaci hydroxylových radikálů, které následně reagují s molekulou proteinu.



Obrázek 14: Schéma experimentu FPOP pro různé druhy radikálů. Převzato z⁴⁸. Směs proteinu s peroxidem vodíku je přiváděna o daném průtoku kapilárou, na kterou je zacílen excimerový laser a dochází ke generaci hydroxylových radikálů nebo uhličitánových radikálů, které následně reagují s molekulou proteinu. V tomto schématu jsou znázorněny 4 typy molekul, oxidovaný protein, hydroxylové radikály, peroxid vodíku a uhličitánové radikály. Uhličitánové radikály pochází z pufru, ve kterém je protein rozpuštěn a nejčastěji se jedná o bikarbonátový pufr nebo acetátový pufr. Schéma pro značení proteinu za asistence laseru je univerzální pro všechny druhy radikálů např. hydroxylové radikály⁴³ nebo uhličitánové radikály⁴⁸.

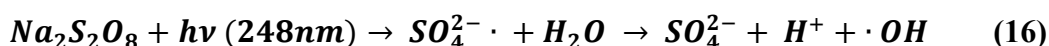
Hamiltonova stříkačka je ovládaná průtokovou pumpou, aby bylo vždy přiměřené množství reaktantů ve směsi. Pokud by bylo více reaktantů ve směsi, docházelo by k přemodifikování molekuly pomocí hydroxylových radikálů, což by vedlo k znehodnocení experimentu. Dalším důvodem průtokové pumpy je rychlost experimentu. Je potřeba velmi rychlé tvoření směsi, aby se následné značení vyrovnalo rychlosti sbalování/rozbalování proteinů. Směs je vstříkována do kapiláry, skrz kterou prochází záření generované laserem, jehož schéma je znázorněno na obrázku 14⁴⁸. Průtok v kapiláře je dán rovnicí (15), převzato a upraveno z⁴⁸:

$$\text{Průtok} = f_{\text{frekvence laseru}} L_{\text{délka laseru}} V_{\text{eluce}} \pi \left(\frac{\text{vnitřní průměr kapiláry}}{2} \right)^2 \quad (15)$$

1.2.2.2 Sulfátové radikály:

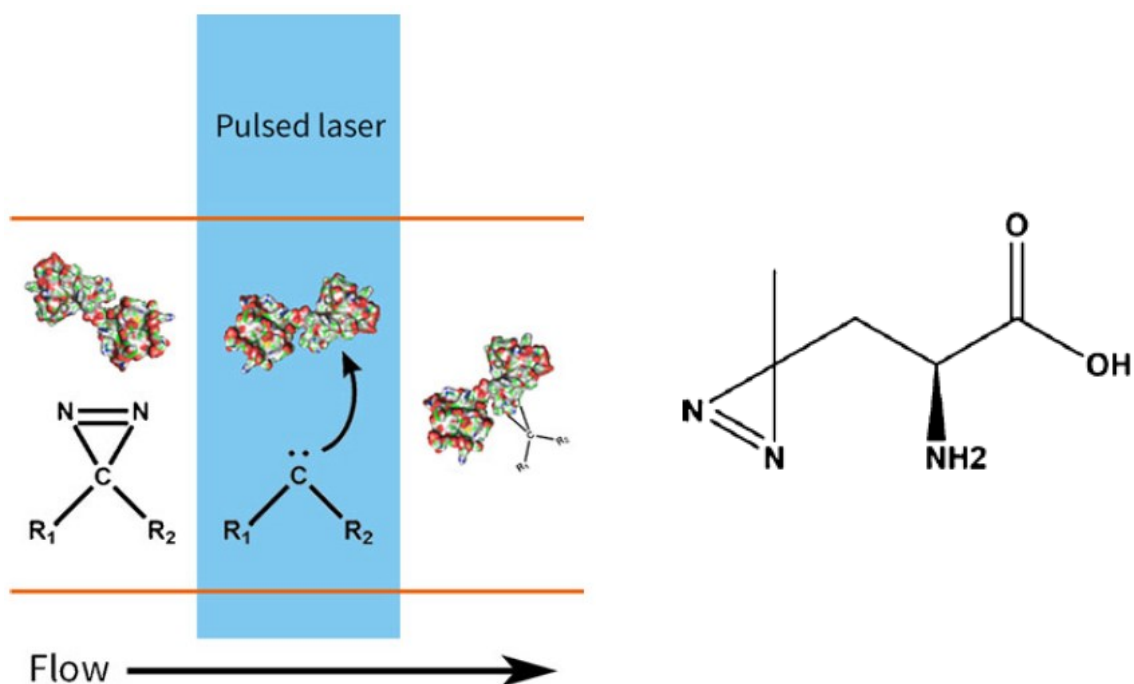
V případě sulfátových radikálů se nejedná o modifikaci přímo pomocí sulfátů. Sulfátový radikál je pouze intermediát, jehož následná reakce s vodou zapříčiní vznik hydroxylového radikálu, který pak dále reaguje s proteinem. Tento typ generace

hydroxylových radikálů byl zaveden v roce 2010, kdy jako výchozí činidlo byl použit peroxodisíran sodný ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$). Reakce byla provedena ve stejném uspořádání jako v případě generace hydroxylových radikálů metodou FPOP⁴³ z peroxidu vodíku. Předmětem této práce bylo zjistit, zda změnou výchozího činidla pro tvorbu radikálů dojde i k jinému množství modifikací na jednotlivých aminokyselinách pro stejný protein. Největší změny pro jednotlivé aminokyseliny byly zaznamenány pro histidin a tyrosin, kde vzrostla jejich reaktivita, což může být zapříčiněno lepší přístupností činidla k těmto residuům před vznikem radikálů⁴⁹. Reakce průběhu experimentu je znázorněna rovnicí (16)⁴⁹.



1.2.2.3 Karbenové radikály

Radikálové značení pomocí karbenových radikálů a následné využití pro „footprinting“ bylo popsáno v roce 2015 Bojiem Zhangem⁵⁰. Ten použil stejnou platformu a laser jako Hambly a Gross v roce 2005^{43,51} (viz Kapitola 1.2.2.1.). Jako modelový protein zvolili apo- a holoformu kalmodulinu, který rozpustili v Tris pufru a přidali 100mM photoleucin. Výsledné produkty byly analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie (Q-TOF)⁵⁰. Schéma experimentu a struktura použitého činidla pro tvorbu radikálu je znázorněna na obrázku 15 str. 28. Výsledná data z MS analýzy kalmodulinu se shodovala s daty, které poskytla rentgeno-strukturní analýza. Tato analýza potvrdila výraznější pokles modifikace u peptidů, které jsou zodpověděny za koordinaci vápenatého kationtu. Pomocí karbenových radikálů se podařilo modifikovat aminokyseliny kyselinu asparagovou a glutamovou, arginin, tyrosin, serin a threonin⁵⁰.



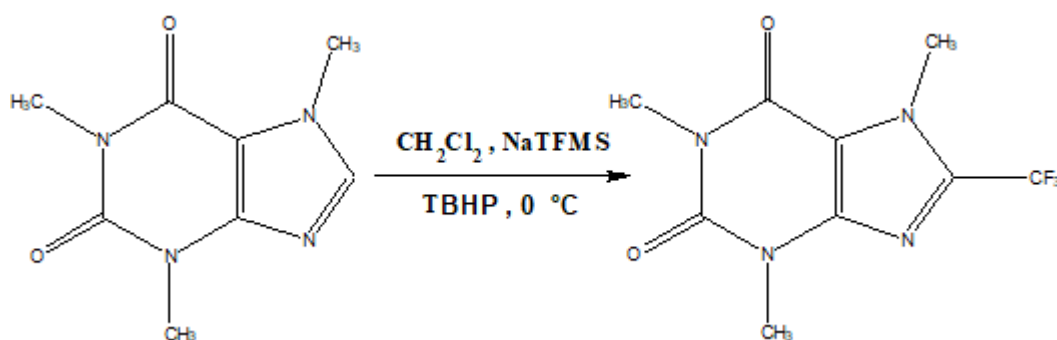
Obrázek 15: Schématické znázornění reakce uhličitánových radikálů s kalmodulem (vlevo) a chemická struktura fotoleucinu (vpravo). Převzato a upraveno z⁵⁰.

1.2.2.4 Jodidové radikály:

Modifikace pomocí jodu se v poměrně velké míře používá v radiofarmakologii k zavádění radioaktivně označeného jodu na aminokyseliny histidin a tyrosin pomocí H_2OI^+ ⁵². Na základě tohoto faktu byla popsána v roce 2012 Jiaweiem Chenem⁵³ metoda, která ke značení proteinu využívá radikály jodu. Jako modelový protein si zvolili myoglobin (jeho apo- a holo- formu), který rozpustili v PBS pufru o výsledné koncentraci proteinu 10 μM . Jako výchozí činidlo pro tvorbu jodidových radikálů byla použita kyselina jodbenzoová a jako zhasič radikálů byl použit histidin. Značení vzorku probíhalo na stejné platformě jako FPOP⁴³. Vzorky byly analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie metodou top-down (ECD fragmentace) i „Bottom up“ (proteolytické štěpení trypsinem (viz kapitola 1.4). Hmotnostní inkrement po modifikaci pomocí jodidových radikálů by měl mít hodnotu 125, 904 Da. Toto se podařilo ověřit a za využití fragmentační analýzy bylo potvrzeno, že pomocí jodidových radikálů je možné modifikovat pouze aminokyseliny tyrosin a histidin⁵³.

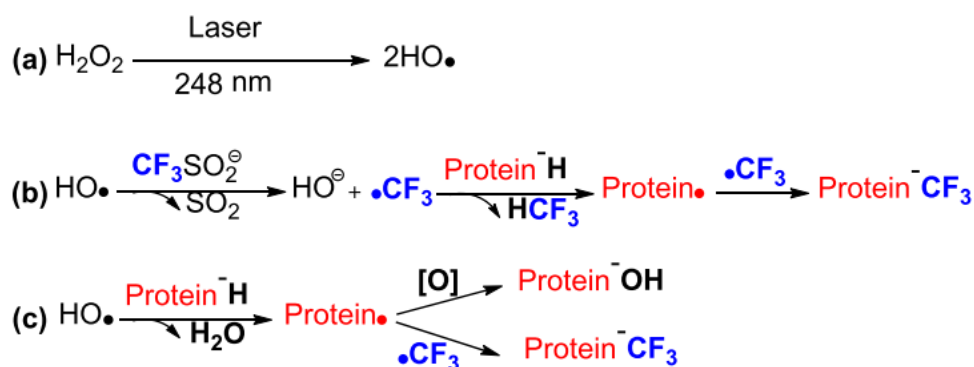
1.2.2.5 Trifluormethylové radikály

Značení pomocí trifluormethylových radikálů provedl v roce 2017 Ming Cheng⁵⁴, který vyšel z již popsaných prací organické chemie, že pomocí tzv. Langloisova činidla lze modifikovat přírodní látky, přesněji kofein⁵⁵. Reakce kofeinu s Langloisovým činidlem (NaTFMS – Trifluormethansulfínát sodný) v dichlormethanu za přítomnosti terc-butylhydroperoxidu (TBHP) při teplotě 0 °C je znázorněna na obrázku 16.



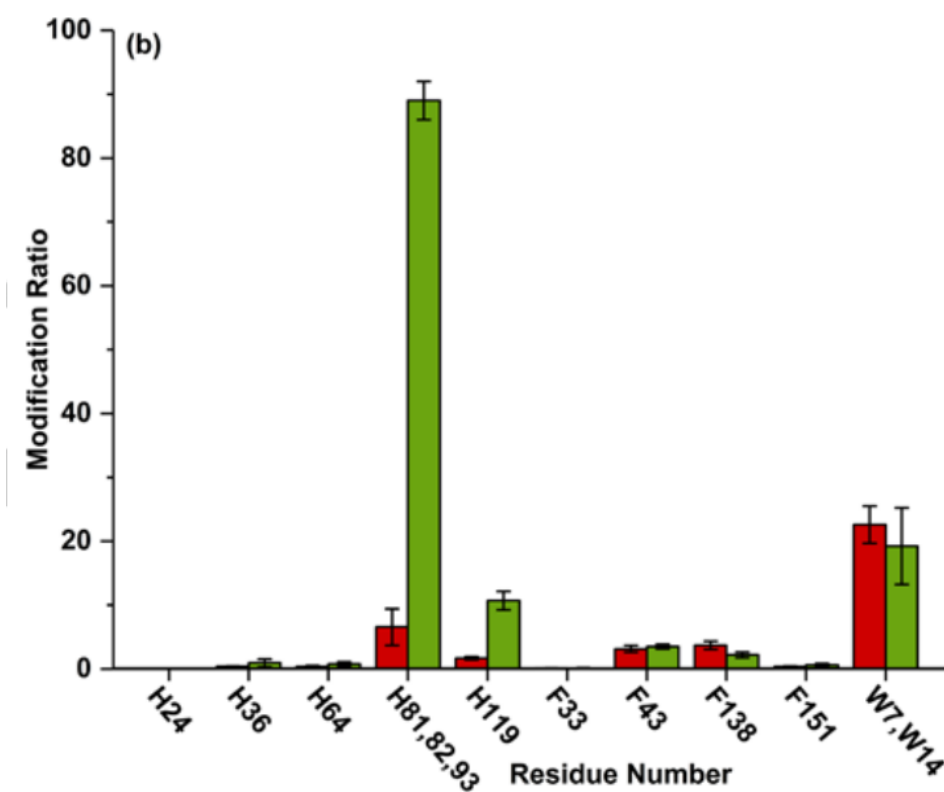
Obrázek 16: Schéma reakce Langloisova činidla s molekulovou kofeinu za vzniku kofeinu značeného trifluormethylovou skupinou. Převzato a upraveno z⁵⁵. Kofein byl rozpuštěn v dichlormethanu a přidáno Langloisovo činidlo (NaTFMS) jako katalyzátor byl použit terc-butylhydroperoxid a reakce probíhala při 0 °C. Výsledný produkt byl ověřen pomocí F¹⁹-NMR.

Cheng toto činidlo (NaTFMS) použil jako generátor trifluormethylových radikálů laserem na platformě FPOP⁴³. Protein byl rozpuštěn za přítomnosti NaTFMS, peroxidu vodíku v PBS pufru o pH 7,4. Laserovým pulsem jsou generovány hydroxylové radikály, které aktivují NaTFMS za vzniku trifluormethylových radikálů, které následně reagují s proteinem. Jako vedlejší produkt dochází k reakci hydroxylových radikálů s proteinem⁵⁴. Schéma tvorby radikálů je naznačeno na obrázku 17.



Obrázek 17: Schéma radikálové reakce Langloisova činidla s peroxidem vodíku za vzniku proteinu označeného trifluormethylovými radikály a hydroxylovými radikály. Převzato a upraveno z⁵⁴. (a) – generace hydroxylových radikálů, (b) – aktivace NaTFMS a vznik trifluormethylových radikálů a následná reakce s proteinem, (c) – vedlejší produkt reakce, značení proteinu hydroxylovými radikály.

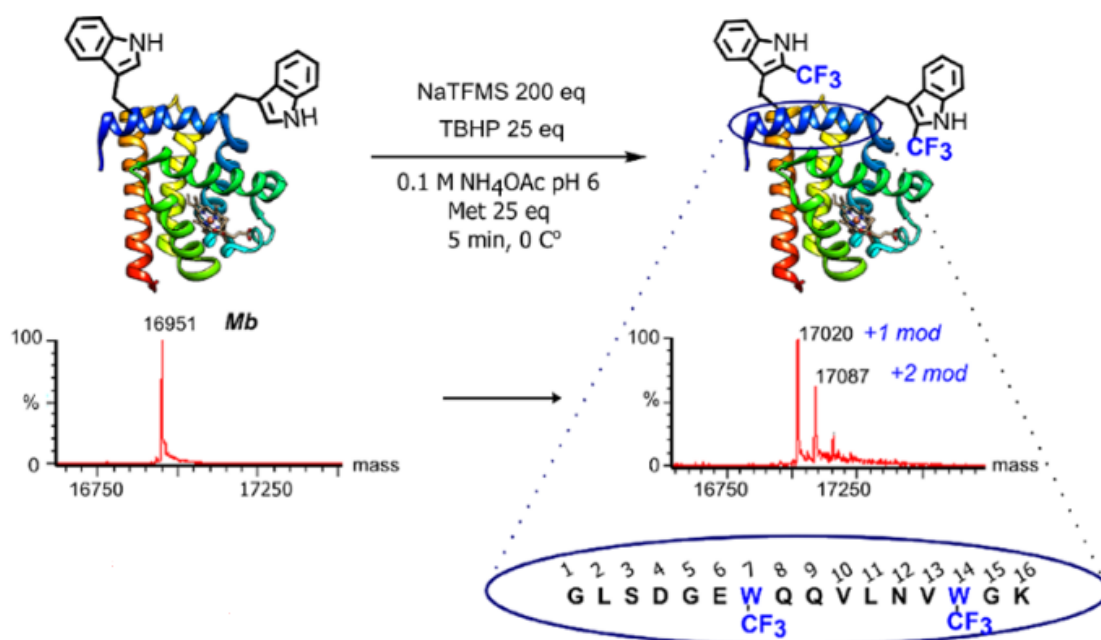
Pomocí trifluormethylových radikálů za asistence laseru se podařilo označit aminokyseliny glycín, alanin, valin, isoleucin, kyseliny glutamovou a asparagovou, threonin, serin, glutamin, asparagin, tryptofan, fenylalanin, histidin, prolin, tyrosin, araginin a lysin. Cílem této práce bylo doplnit informaci z hydroxylového „footprintingu“ o schopnost označit více aminokyselin a tím získat komplexnější informaci o struktuře zkoumané molekuly⁵⁴. Jeden z modelových proteinů, který si pro tento experiment zvolil myoglobin (apo- a holoforma)⁵⁴. Po označení proteinů, byl protein proteolyticky rozštěpen pomocí trypsinu a jednotlivé peptidy rozděleny kapalinovou chromatografií, výsledná kvantifikace aromatických aminokyselin je znázorněna na obrázku 18.



Obrázek 18: Výsledná kvantifikace modifikovaných aromatických aminokyselin apo- a holoformy myoglobinu pomocí CF_3 – „footprintingem“ za asistence KrF laseru. Převzato a upraveno z⁵⁴. Červená – holomyoglobin, zelená – apomyoglobin. Největší rozdíly mezi holo a apoformou jsou u regionu aminokyseliny H81, H82, H93 a H119, kde v přítomnosti hemu dochází k poklesu modifikací.

Trifluormethylové radikály pro označení proteinu využil v roce 2018 Mateusz Imiołek⁵⁶, který vycházel ze stejného činidla (NaTFMS) jako Cheng⁵⁴, ale ke značení nevyužíval laser. Myoglobin (směs aminokyselin) vložil do 100mM acetátu amonného pH 6 (1 M acetát amonný pro AMK), přidal 300x nadbytek NaTFMS (10x nadbytek pro

směs aminokyselin), 25x nadbytek methioninu (2,5x nadbytek pro směs aminokyselin) a 25x nadbytek terc-butylhydroperoxidu (2,5x nadbytek pro směs aminokyselin). Reakce byla ponechána při 0 °C po dobu 5 minut - 48 hodin (jednotlivé časové kroky reakce byly zastaveny pomocí 4-hydroxy-TEMPO). V případě proteinu byl produkt přečištěn pomocí gelové chromatografie a v případě aminokyselin byl produkt zmražen kapalným dusíkem a lyofilizován⁵⁶. Analýza aminokyselin byla prováděna pomocí ¹⁹F-NMR, kde nejvíce reaktivní aminokyseliny vůči trifluormethylovým radikálům byly tryptofan, dále cystein a slabě histidin, fenylalanin a tyrosin. Analýza myoglobinu byla provedena za využití proteolytického štěpení a následné analýzy peptidů pomocí LC-MS. Výsledek analýzy dat prokázal jako modifikované aminokyseliny tryptofany na pozici 7 a 14⁵⁶. Výsledné MS spektrum a schéma reakce je znázorněno na obrázku 19.



Obrázek 19: Výsledné MS spektrum po modifikaci trifluormethylovými radikály za přítomnosti terc-butylhydroperoxidu a schématické znázornění průběhu reakce. Převzato a upraveno z⁵⁶. V horní části obrázku je znázorněné schéma radikálového značení myoglobinu a v dolní části je výsledné spektrum pořízené pomocí hmotnostní spektrometrie.

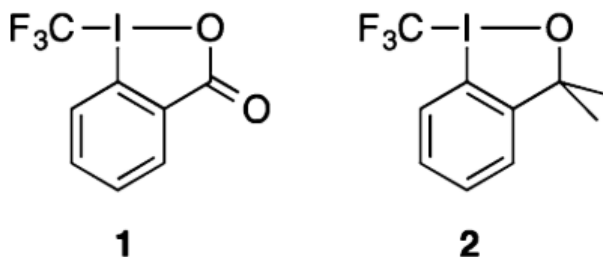
Mateusz Imiolek vyvinul tuto metodu primárně pro zavádění fluoru do molekuly proteinu a jeho propojení s ¹⁹F-NMR⁵⁶. Tato metoda však byla první metodou radikálového značení proteinu, které nevyžaduje laserovou asistenci⁵⁶.

Možnost značení biomolekul bez asistence laseru byla jednou z našich hlavních podmínek pro vývoj nové metody radikálového značení. Dalšími podmínkami byla možnost

realizovat značení ve vodném prostředí a v krátkém časovém úseku. Jako výchozí látku pro tvorbu radikálů jsme si zvolili Togniho činidla.

1.3 Togniho činidla

Togniho činidla byla vyvinuta v roce 2006 Antoniem Tognim⁵⁷, který syntetizoval dva typy těchto činidel – kyselé a alkoholové, znázorněné na obrázku 20.



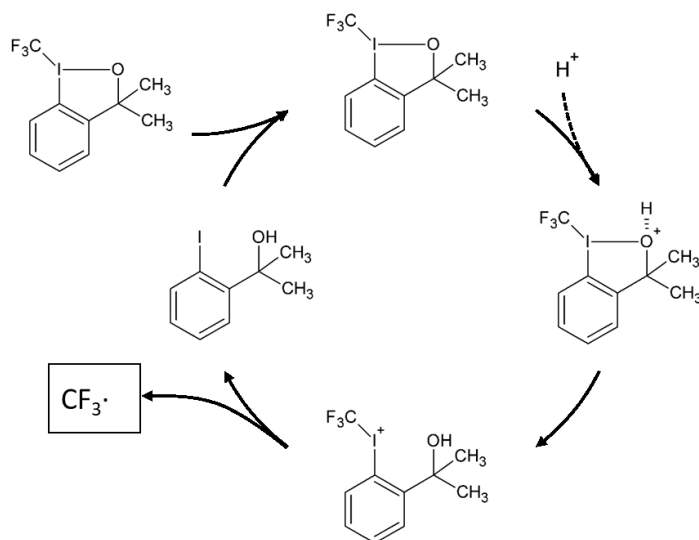
Obrázek 20: Znázornění dvou typů Togniho činidel. Převzato a upraveno z⁵⁸.

(1) – kyselé činidlo (1-(trifluoromethyl)-1,2-benziodoxol-3(1H)-on)

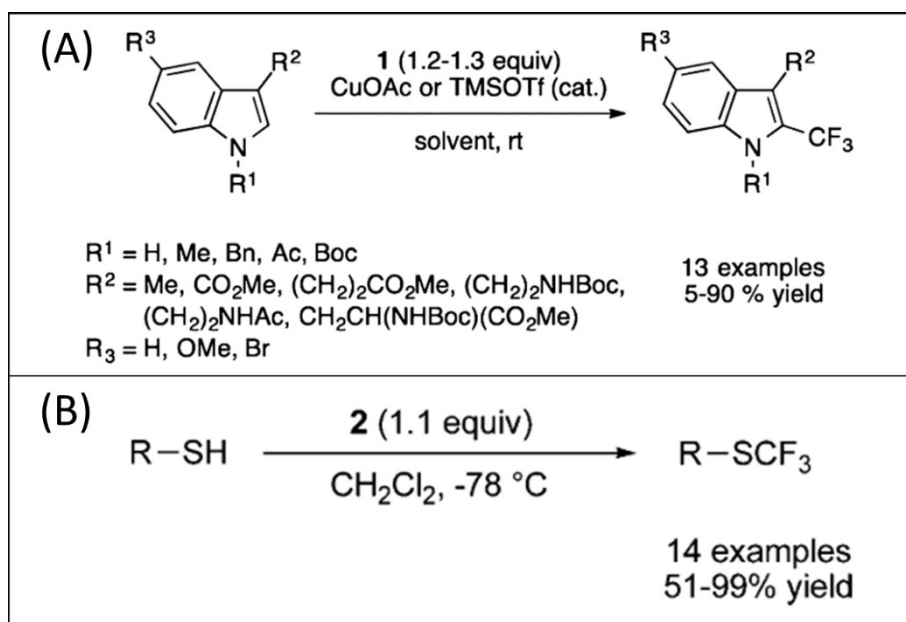
(2) – alkoholové činidlo (trifluoromethyl-1,3-dihydro-3,3-dimethyl-1,2-benziodoxol)

Společným znakem Togniho činidel je hypervalentní jod. Činidla se dále dají rozdělit do dvou skupin podle své postranní skupiny. První skupina (1) obsahuje oxo skupinu a druhá skupina (2) obsahuje dimethylovou skupinu. Tato činidla byla primárně vyvinuta pro trifluormethylaci molekul v organické syntéze. Aby bylo možné tato činidla použít je nutné je aktivovat. Existují dva přístupy aktivace. První probíhá pomocí Lewisovy kyseliny a druhý pomocí mědi a jejích komplexů⁵⁸. Aktivace pomocí Lewisovi kyseliny je znázorněna na obrázku 21 str. 33.

Po aktivaci Togniho činidla jsou vzniklé radikály schopny reagovat například s thioley, alkoholy, aromatickými kruhy, α -nitroestery, β -ketoestery a fosfiny^{58,59}. Těchto skupin se hojně využívalo při organické syntéze jako možných cílů pro trifluormethylaci. Zároveň se tyto skupiny velmi často vyskytují v biomolekulách a jsou nedílnou součástí např. aminokyselin. Například thiol je obsažen v aminokyselině cysteinu a mezi aminokyselinami s aromatickými kruhy můžeme zařadit hned čtyři potencionální cíle pro modifikaci pomocí Togniho činidel. Schéma modifikace indolového kruhu a thiolu je znázorněno na obrázku 22 str. 34.



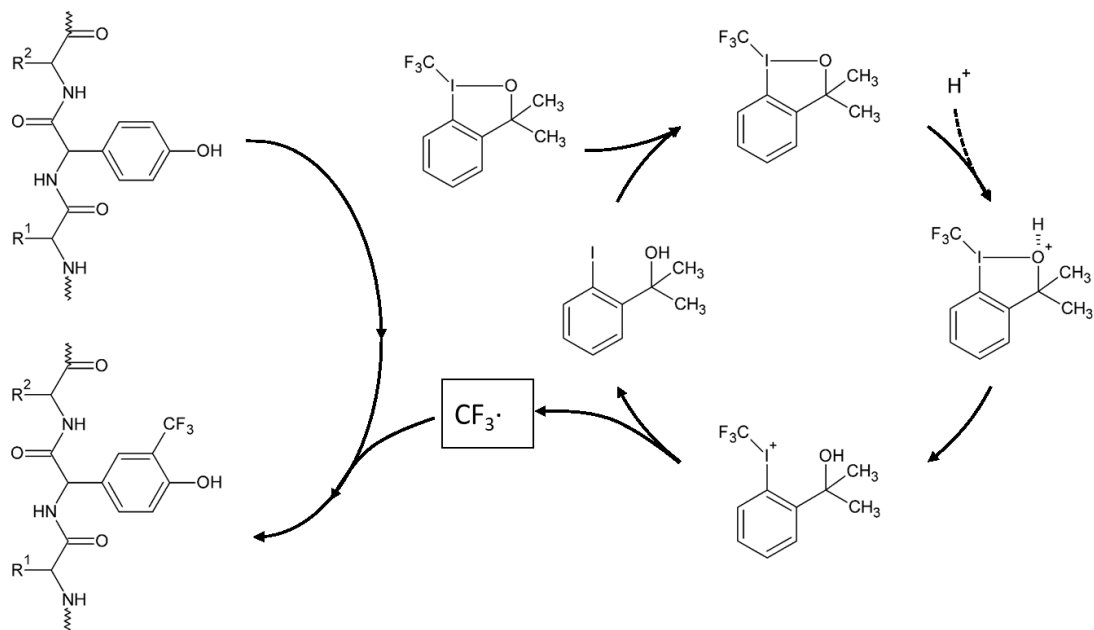
Obrázek 21: Schéma aktivace Togniho činidel pomocí Lewisovi kyseliny. Převzato a upraveno z⁵⁸. Proton vodíku pochází z Lewisovi kyseliny, který se naváže na kyslík, následně dochází k rozpadu vazby mezi kyslíkem a jodem a vzniká protonovaný jod, který se následně deprotonuje za vzniku trifluormethylového radikálu.



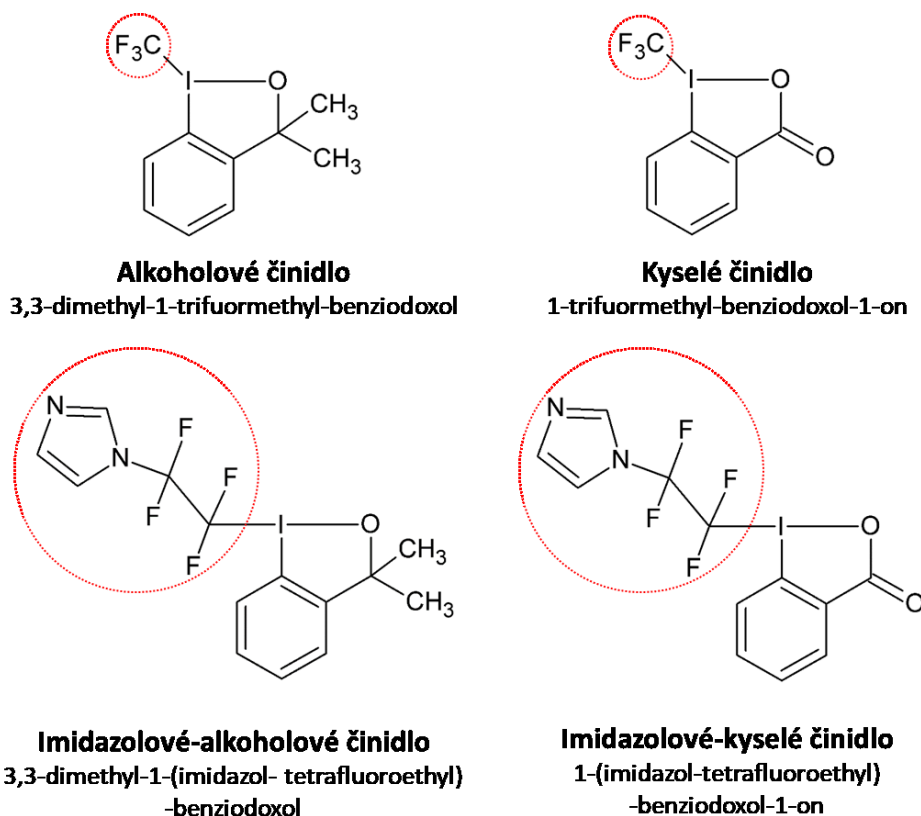
Obrázek 22: Příklad reakce Togniho činidla s indolem (A) a s thiolem (B). Převzato a upraveno z⁵⁸. Na obrázku jsou znázorněny podmínky, za kterých probíhala organická syntéza trifluormethylace indolu (a) kdy byl jako aktivátor činidla použit komplex mědi, a v případě trifluormethylace thiolu (b) byla použita Lewisova kyselina.

Na základě těchto poznatků z organické syntézy jsme vytvořili schéma průběhu experimentu s proteiny (obrázek 23 str. 35) a vznikla myšlenka vytvořit metodu radikálového značení a následného „footprintingu“ proteinů a proteinových komplexů bez laserové asistence za

použití Togniho činidel. Pro tento účel byly firmou *CF plus chemicals* syntetizovány další dva typy činidel, které se liší typem vzniklého radikálu. Přehled všech použitých Togniho činidel v této práci je znázorněn na obrázku 24 str. 35.



Obrázek 23: Výsledné schéma experimentu reakce Togniho činidel s molekulou proteinu. Převzato a upraveno z⁵⁸. Po aktivaci Togniho činidla dochází ke vzniku radikálu, který dále reaguje s molekulou proteinu (např. postranním řetězcem tyrosinu).



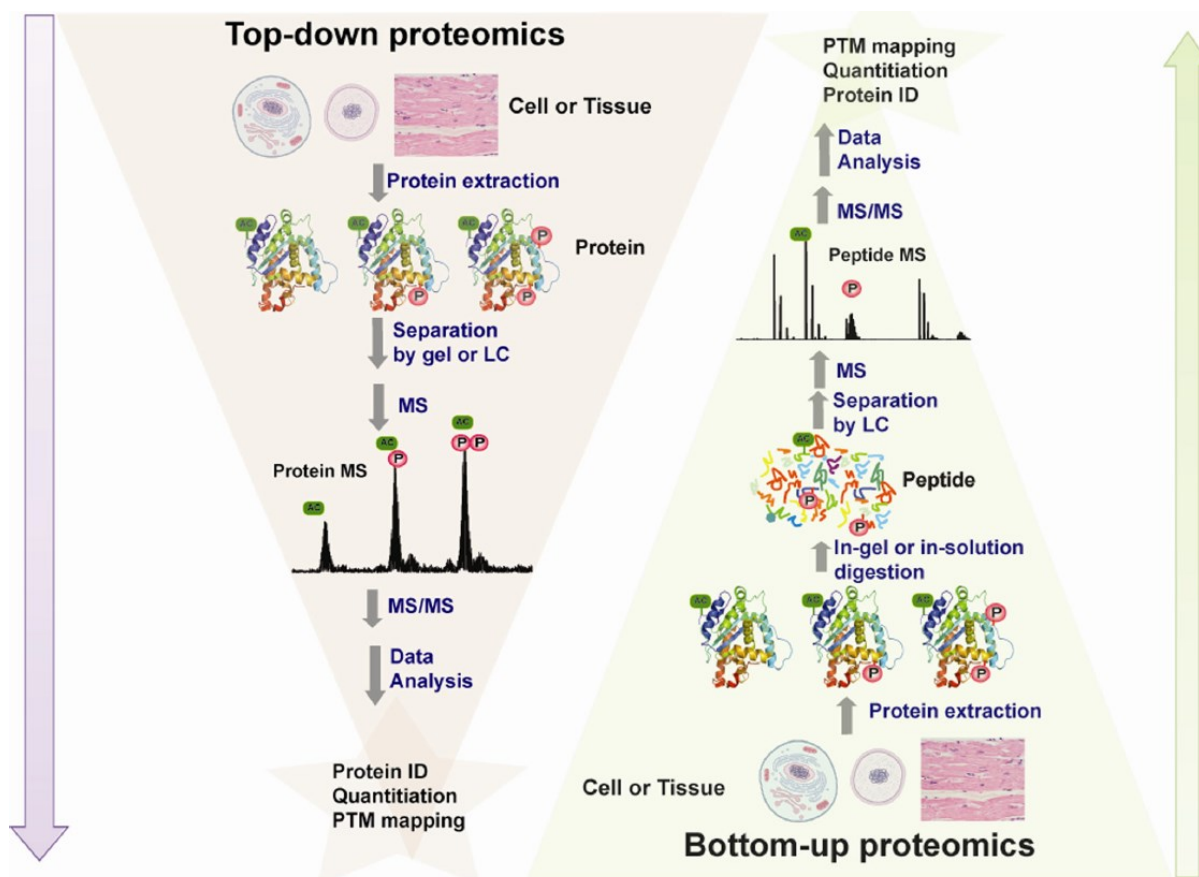
Obrázek 24: Chemické struktury všech čtyř Togniho činidel použitých v této práci. Převzato a upraveno z⁵⁷⁻⁵⁹. Alkoholové a kyselé činidlo tvoří trifluormethylový radikál a imidazolové kyselé a alkoholové činidlo tvoří imidazol-tetrafluorethylový radikál. Výsledné radikály jsou zvýrazněné červeným kruhem.

1.4 Analýza biomolekul pomocí hmotnostní spektrometrie

Možnost využití MS pro použití strukturní biologie je spojeno s vynálezem měkkých ionizačních technik (techniky které při ionizaci vzorků nefragmentují vzorek), mezi které se řadí ionizace pomocí elektrospreje (ESI – Electrospray ionization) a ionizace vzorku laserem za účasti matrice (MALDI – matrix assisted laser desorption/ionization)^{60,61}. Tyto techniky lze s výhodou spojit s kapalinovou chromatografií (LC-MS) která umožňuje separaci a analýzu proteinů, proteinových fragmentů (z angl. Protein digest) nebo jiných chemicky významných či biologických látek např. ve farmacii^{62,63}.

S využitím LC-MS souvisí jeden ze základních přístupů jak analyzovat proteiny a detekovat posttranslační modifikace (PTMs) a to bottom-up přístup. Tato technika je založená na enzymatickém štěpení proteinů specifickými proteasami, z nichž nejvyužívanější je trypsin, který štěpí na C-konci lysinu a argininu⁶⁴⁻⁶⁶. Druhým z hlavních přístupů proteomiky je tzv. top-down, při tomto přístupu dochází k fragmentaci proteinů/peptidů až přímo v instrumentu (např. kolizní cela trojitého kvadrupólu, ICR cela).

Tyto fragmentační techniky lze rozdělit do dvou skupin: energetická disociace (z angl. energetic dissociation) a disociaci pomocí elektronu (z angl. non-ergodic dissociation)⁶⁶. Mezi nejpoužívanější energetické disociace patří CID – kolizně indukovaná disociace z angl. collision-induced dissociation, při které dochází ke kolizi pomocí plynu v kolizní cele^{67,68}, laserové fragmentační techniky jsou UVPD – z angl. ultraviolet photodissociation⁶⁹ a IRMPD z angl. infrared multiple photon dissociation⁷⁰. Energetické disociační techniky nejsou vhodné pro analýzu posttranslačních modifikací, protože velmi často dochází k fragmentaci nejdříve na vazbě k dané posttranslační modifikaci a následně k disociaci peptidové vazby a tak může docházet ke ztrátě informace⁷¹. Tento problém je však možné vyřešit použitím disociací pomocí elektronů jako jsou ETD – disociace přenosem elektronu (z angl. electron transfer dissociation)⁷² a ECD – disociace záchytem elektronu (z angl. electron capture dissociation), které fragmentují pomocí elektronu^{73,74}. Oba přístupy jsou znázorněny na obrázku 25 str. 37.



Obrázek 25: Schéma rozdílu experimentů top-down a bottom-up. Převzato z⁶⁶. Při top-down experimentu je protein izolovaný z buněk pomocí různých izolačních postupů (např. afinitní a gelová chromatografie nebo lze potřebný protein analyzovat z elektroforetického gelu) a analyzován pomocí MS a MS/MS technik. Bottom-up experiment je totožný co se týče přípravy proteinu, dále se pak protein nejdříve štěpí pomocí proteas a výsledné peptidy jsou poté analyzovány pomocí LC-MS a LC-MS/MS.

2 Cíle práce

- Optimalizace podmínek radikálové reakce
- Identifikace aminokyselin modifikovaných fluoralkylovými radikály
- Značení modelových proteinů fluoralkylovými radikály a následná analýza hmotnostní spektrometrií
- Studium konformačních změn mezi apo- a holoformy myoglobinu fluoralkylovými radikály

3 Materiál

3.1 Biologický materiál

Ubiquitin z hovězích erytrocytů	Sigma-Aldrich, USA
Myoglobin z koňského srdce	Sigma-Aldrich, USA
Trypsin	Promega, USA
Směs α -L-aminokyselin	Sigma-Aldrich, USA

3.2 Seznam chemikálií

1-trifuormethyl-benziodoxol-1-on	The CF Plus Chemicals s.r.o., CZ
1-(imidazol-tetrafluoroethyl)-benziodoxol-1-on	The CF Plus Chemicals s.r.o., CZ
3,3-dimethyl-1-trifuormethyl-benziodoxol	The CF Plus Chemicals s.r.o., CZ
3,3-dimethyl-1-(imidazole tetrafluoroethyl)-benziodoxole	The CF Plus Chemicals s.r.o., CZ
4-ethylmorfolin	Sigma-Aldrich, USA
Acetonitril (LC-MS čistota)	Merck, Německo
Amonium bikarbonát	Sigma-Aldrich, USA
Dimethylsulfoxid	Merck, Německo
Ethanol	Merck, Německo
ESI tuning mix for ion trap (směs standardů pro kalibraci ESI)	Sigma-Aldrich, USA
Helium	Linde gas a.s, CZ
Isopropylalkohol (LC-MS čistota)	Merck, Německo
Kyselina askorbová	Sigma-Aldrich, USA
Kyselina chlorovodíková (LC-MS čistota)	Sigma-Aldrich, USA
Kyselina mravenčí (LC-MS čistota)	Sigma-Aldrich, USA
Kyselina octová (LC-MS čistota)	Sigma-Aldrich, USA
Kyselina trifluoroctová (LC-MS čistota)	Sigma-Aldrich, USA
Methanol (LC-MS čistota)	Merck, Německo
Methylethyl keton (2-butanon)	Merck, Německo
L-Tryptofan	Sigma-Aldrich, USA
Oxid uhličitý	Linde gas a.s., CZ
Voda (LC-MS čistota)	Merck, Německo

3.3 Seznam přístrojů a materiálů

Analytické váhy	Mettler Toledo, Švýcarsko
Amicon® Ultra-15 centrifugační zkumavky, cut-off 10 kDa	Merck, Německo
Automatické pipety	Mettler Toledo, Švýcarsko
Centrifuga stolní, Minispin	Eppendorf, Německo
Elektroda pH metro Biotrode	Hamilton, Švýcarsko
Q-TOF Maxis II	Bruker Daltonics, Německo
Hmotnostní spektrometr solariX XR 15T	Bruker Daltonics, Německo
UHPLC systém Agilent 1290	Agilent Technologies, USA
Chladicí lázeň	Pharmacia Biotech, Švédsko
Chromatografické kolony:	
HILIC kolona Intrada amino acid, (2,1x150 mm) velikosti částic 3 µm	Imtakt, USA
Luna® Omega o velikosti částic 5 µm Polar C18, velikost pórů 100 Å (0,3x30 mm)	Phenomenex, USA
Luna® Omega o velikosti částic 3 µm Polar C18, velikost pórů 100 Å (0,3x150 mm)	Phenomenex, USA
ENrich™ SEC 70 10 x 300 mm (500 Da – 70 kDa)	Biorad, USA
MicroTrap™ - peptidová	Michrom Bioresources, USA
MacroTrap™ - proteinová	Michrom Bioresources, USA
Zeba™ Spin odsolovací kolony	Thermo Scientific, USA
pH metr Orion 2D star	Thermo Scientific, USA
pH metr Φ200	Beckman, USA
Předvážky HF1200G	AND, USA
Ultrazvuková lázeň	Bandellin, Německo
Termostat stolní	Grant, Velká Británie
Termostat Thermomixer Comfort	Eppendorf, Německo
UV-VIS spektrometr DeNovix DS-11	DeNovix, USA
Vakuová odparka Savant SPD 121P	Thermo Scientific, USA
Vakuová odparka Speedvac	Jouan, Francie
Vialky se septem	Agilent Technologies, USA
Vodní lázeň	Memert, Německo
Vortex VELP	Scientifica, Itálie

3.4 Seznam roztoků

Mobilní fáze pro LC-MS analýzu aminokyselin pomocí HILIC chromatografie

Fáze A – 100 mM amonium acetát

Fáze B – 0,1% kyselina mravenčí v 98% ACN

Mobilní fáze pro LC-MS analýzu peptidů pomocí chromatografie s reverzní fází

Fáze A – 0,1% kyselina mravenčí v 2% ACN

Fáze B – 0,1% kyselina mravenčí v 98% ACN

Značící pufr pro reakci s Togniho činidly

50mM amonium bikarbonát pH 7,4 sycený pomocí helia

Zhášecí pufr pro reakci s Togniho činidly

Tryptofan o koncentraci 10 mg/ml rozpuštěný v značícím pufru

3.5 Softwarové vybavení

Data Analysis 5.0

Ms2Links

MASCOT

PyMol 1.7.2.1

Prism 8.0

Bruker Daltonics, Německo

Algoritmus pro vyhodnocení MS dat
kovalentního značení⁷⁵

Matrix Science, Velká Británie

Schrödinger, USA

GraphPad Software, Inc

4 Metody

4.1 Příprava značícího pufru pro reakci proteinu s Togniho činidly

Amonium bikarbonát byl rozpuštěn v LC-MS vodě na finální koncentraci 50 mM. Pufř byl následně sycen cca 5 minut heliem. Po probublání heliem byl pufř odplyněn na ultrazvukové lázni a znovu probublán heliem. Výsledné upravení pH bylo prováděno sycením pomocí oxidu uhličitého na hodnotu pH 7,4.

4.2 Radikálové značení aminokyselin s Togniho činidly

Směs 19 proteinogenních aminokyselin a cystinu (Sigma-Aldrich, USA) byla rozpuštěna ve značícím pufru o finální koncentraci aminokyselin 2 mM. K aminokyselinám byl přidán 10x nadbytek (na každou aminokyselinu) kyselého činidla rozpuštěného v dimethylsulfoxidu o koncentraci 30 mM, následně byla přidána kyselina askorbová v 5x nadbytku (na každou aminokyselinu) rozpuštěná ve značícím pufru o koncentraci 238 mM. Reakce byla ponechána 15 minut při laboratorní teplotě, reakce byla zastavena okyselením pomocí kyseliny octové na výslednou 1% koncentraci. Popsaným způsobem připravený vzorek byl analyzován pomocí LC-MS.

4.3 LC-MS analýza aminokyselin po radikálovém značení pomocí Togniho činidel

Produkt reakce byl nanesen na HILIC kolonu (Imtakt USA, Intrada amino acid, 2,1x150 mm, velikost částic 3 μ m) kde separace byla prováděna 15 minutovým gradientem z 20% pufru A (100mM amonium acetát), 80% pufru B (0,1% kyselina mravenčí v ACN) do 100% pufru A. Chromatografie byla propojena s Q-TOF Maxis II (Bruker Daltonics, Germany) hmotnostním spektrometrem. Měření bylo provedeno RNDr. Danielem Kavanem, Ph. D.

4.4 Příprava proteinů pro radikálové značení

Lyofilizované proteiny (Ubiquitin – UBQ, Myoglobin – Mb) byly rozpuštěny ve značícím pufru a následně přečištěny pomocí gelové chromatografie (ENrich™ SEC 70,

Biorad, USA) nebo odsolovacích kolonek (Zeba spinTM, Thermo Scientific, USA). Po přečištění byla spektrofotometricky stanovena koncentrace proteinu (UV-VIS spektrometr DeNovix DS-11, DeNovix, USA).

4.5 Příprava apomyoglobinu

Dvanáct miligramů myoglobinu (Sigma-Aldrich, USA) bylo rozpuštěno v 5 ml značícího pufru a v ledové lázni byl roztok okyselen pomocí kyseliny chlorovodíkové (Sigma-Aldrich, USA) na pH 1,5. Následně byl roztok převeden do dělicí nálevky, do které bylo přidáno 20 ml 2-butanonu (Merck, Německo). Dělicí nálevka byla vytřepána a ponechána 15 minut pro ustálení. Následně byla odebrána bezbarvá vodná fáze s apoformou myoglobinu a ta byla zakoncortována (Amicon® Ultra-15 centrifugační zkumavky, Cut-off 10 kDa) a následně přečištěna pomocí gelové chromatografie (ENrichTM SEC 70, Biorad, USA) ekvilibrované ve značícím pufru. S proteinem bylo následně postupováno podle kapitoly 4.2.

4.6 Optimalizace radikálového značení ubiquitinu Togniho činidly

Pro optimalizaci radikálového značení bylo zvoleno 20 µg jako výchozí množství proteinu vždy rozpuštěného ve značícím pufru (viz kapitola 4.1) a přečištěného (viz kapitola 4.2). Všechna Togniho činidla byla rozpuštěna v dimethylsulfoxidu o finální koncentraci 50 mg/ml a kyselina askorbová (Sigma-Aldrich, USA) byla rozpuštěna ve značícím pufru o finální koncentraci 50 mg/ml. Kyselina askorbová byla vždy připravena před každou značící reakcí. Jednotlivé podmínky reakce jsou znázorněny v tabulce 1.

Tabulka 1: Podmínky jednotlivých reakcí UBQ s Togniho činidly

Činidlo	Objem roztoku UBQ o koncentraci 1,5 mg/ml [µl]	Objem T. činidla o koncentraci 50 mg/ml [µl]	Objem kys. askorbové o koncentraci 50 mg/ml [µl]	Čas [s]	Objem zhášecího pufru [µl]
Kyselé	14	1.48	0.62	300, 60, 30, 15	1
Alkoholové	14	1.54	0.62	30	1
Imidazol-kys.	14	1.93	0.62	30	1
Imidazol-alko.	14	2.24	0.62	30	1

Jednotlivé reakce byly provedeny v poměru 1:100:75 (protein: Togniho činidlo: kyselina askorbová) a charakterizovány pomocí hmotnostní spektrometrie.

4.7 MS Analýza proteinů před i po značení Togniho činidly

10 µg proteinu (ubiquitin – UBU, nebo myoglobin – Mb) bylo odsoleno na koloně MacroTrap™ 5% kyselinou octovou. Protein byl z kolony eluován 40 µl 80% acetonitrilem s 5% kyselinou octovou. Po odsolení byl protein 5x zředěn do elektrosprejového pufru (50% methanol o čistotě pro použití LC-MS s 0,1% kyselinou mravenčí) a změřen na hmotnostním spektrometru solariX XR 15T (Bruker Daltonics, Německo) s iontově cyklotronovou rezonanční celou a Fourierovou transformací (FT-ICR). Ionizace probíhala pomocí elektrospreje v pozitivním modu s akvizicí 2 miliony databodů v rozsahu m/z 250-2000. Výsledná spektra vznikala s akumulací iontů 0,2 s v kolizní cele a průměrováním osmi až stovacetosmi po sobě následujících spekter.

4.8 Fragmentační analýza ubiquitinu hmotnostní spektrometrií (Top-down)

4.8.1 ETD

Nejvíce intenzivní nábojové stavy (11-13+) pro nemodifikovaný, 1x modifikovaný a 2x modifikovaný UBU byly izolovány společně v izolačním okně 3-5 m/z pro každý jednotlivý nábojový stav. Následně byly izolované nábojové stavy podrobeny fragmentaci pomocí ETD, jednotlivé parametry ETD jsou znázorněny v tabulce 2.

Tabulka 2: Parametry ETD fragmentace

Akumulace iontů	500 ms
Akumulace fluoranthonového aniontu	500 ms
Reakční čas	300ms
Celkový čas ETD experimentu	800 ms

Fragmentační spektra byla pořizována za akumulace 0,5 – 1 sekund a v pozitivním modu s akvizicí 2 miliony databodů v rozsahu m/z 250-2000 a vznikla průměrováním 32 – 64 po sobě následujících spekter.

4.8.2 Kombinace CID-ECD

Izolace nábojových stavů byla provedena totožně jako v případě fragmentace pomocí ETD. Parametry CID a ECD jsou znázorněny v tabulce 3.

Tabulka 3: Parametry CID-ECD fragmentace

CID	
Kolizní plyn	Argon
Kolizní energie	-3,0 eV
ECD	
Doba aktivace	0,0075 s
ECD bias	0,9 V
ECD Lens	10 V

Fragmentační spektra byla pořizována za akumulace 0,5 – 1 sekund v pozitivním modu s akvizicí 2 miliony databodů v rozsahu m/z 250-2000 a vznikla průměrováním 32 – 64 po sobě následujících spekter.

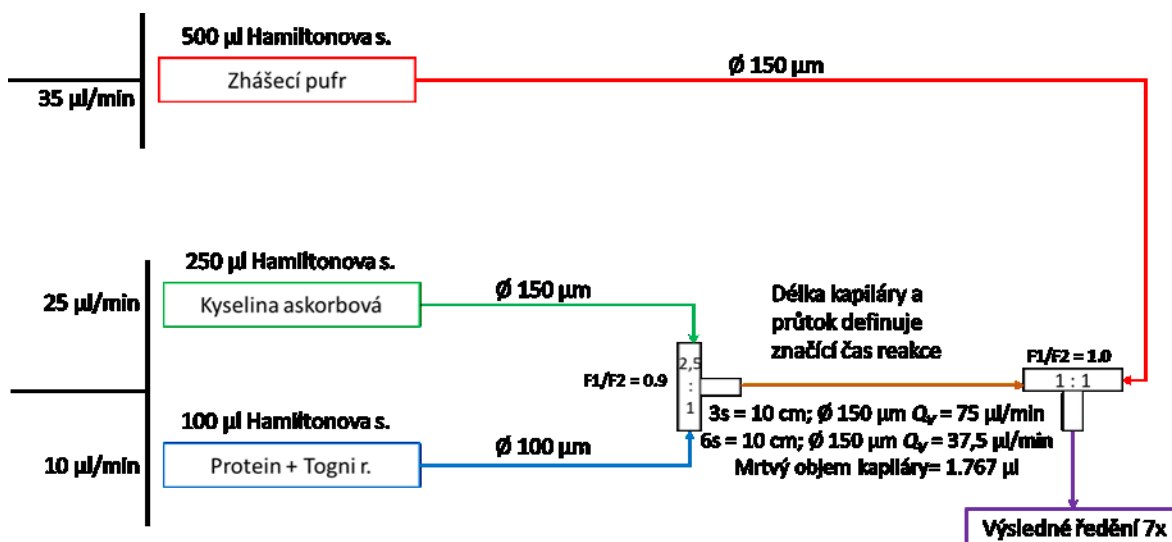
4.9 Optimalizace radikálového značení apo- a holomyoglobinu Togniho činidly

Pro optimalizaci radikálového značení bylo zvoleno 10 μg jako výchozí množství proteinu vždy rozpuštěného ve značícím pufru (viz kapitola 4.1) a přečištěného (viz kapitola 4.2). Všechna činidla byla rozpuštěna v dimethylsulfoxidu o finální koncentraci 50 mg/ml a kyselina askorbová (Sigma-Aldrich, USA) byla rozpuštěna ve značícím pufru o finální koncentraci 10 mg/ml. Kyselina askorbová byla vždy připravena před každou značící reakcí. Jednotlivé podmínky reakce jsou znázorněny v tabulce 4.

Tabulka 4: Jednotlivé podmínky reakcí a/hMb s Togniho činidly

Činidlo	Objem roztoku a/hMb o koncentraci 0,65 mg/ml [μl]	Objem T. činidla o koncentraci 50 mg/ml [μl]	Objem kys. askorbové o koncentraci 10 mg/ml [μl]	Čas [s]	Objem zhášecího pufru [μl]
Kyselé	15,3	0,4	0,5	30, 6, 3, 1	1
Alkoholové	15,3	0,4	0,5	30, 3	1
Imidazol-kys.	15,3	0,5	0,5	30, 3	1
Imidazol-alko.	15,3	0,6	0,5	30, 3	1

Jednotlivé reakce byly provedeny v poměru 1:100:50 (protein: Togniho činidlo: kyselina askorbová) a charakterizovány hmotnostní spektrometrií. V případě 30 sekund byla reakce provedena manuálně pomocí pipet a čas byl měřen stopkami. Reakce v časových bodech 6, 3 a 1 sekunda byly prováděny v průtokovém reaktoru, jehož popis a schéma je znázorněno na obrázku 26.



Obrázek 26: Schéma průtokového reaktoru použitého pro značení proteinů pomocí Togniho činidel. Průtokový reaktor je složen ze tří Hamiltonových stříkaček (červená obsahuje zhášecí pufr, zelená obsahuje aktivátor Togniho činidla a modrá obsahuje protein s Togniho činidlem), které jsou ovládané pomocí stolních lineárních pump specificky definovaným průtokem. Hnědá šipka znázorňuje značící kapiláru, jejíž parametry určují čas, po který bude radikálové značení probíhat. Výsledný produkt reakce je 7x zředěný.

4.10 Enzymatické štěpení vzorků

K cca 20 µl reakce a/hMb s Togniho činidly (v případě vzorků vzniklých pomocí průtokového reaktoru bylo nutné vzorky vysušit na vakuové odparce Speedvac na požadovaný objem) bylo přidáno 20 µl štěpicího pufru pH 8,4 a 2,5 µl acetonitrilu. V závislosti na množství proteinu byla přidána proteasa trypsin a to 1 µg proteasy na 10 µg proteinu. Po 2 hodinách reakce při 37 °C bylo opětovně přidáno stejné množství proteasy a znovu necháno štěpit 2 hodiny při 37 °C. Reakce byla ukončena okyselením vzorku pomocí trifluoroctové kyseliny do výsledné koncentrace 0,1 %.

4.11 LC-MS analýza vzorků a/hMb po radikálovém značení Togniho činidly

Ze vzorků po proteolytickém štěpení bylo odebráno 15 μl a k nim bylo přidáno 15 μl 0,1% trifluoroctové kyseliny, aby bylo dosaženo požadovaného ředění. Takto vzniklé roztoky byly převedeny do vialek a 5-10 minut sonikovány v ultrazvukové lázni (Bandellin, Německo).

Analýza vzorků byla prováděna na UHPLC systému Agilent 1290 series. Na kolonu Luna® Omega o velikosti částic 5 μm Polar C18, velikost pórů 100 Å (0,3x30 mm) bylo naneseno 5 μl vzorku o koncentraci proteinu 0,1 mg/ml. Odsolení proteinu probíhalo 5 minut při průtoku 0,01 ml/min. Následně byly peptidy z kolony eluovány gradientem mobilních fází (fáze A: 0,1 % kyselina mravenčí v 2% ACN; fáze B: 0,1% kyselina mravenčí v 98% ACN) po dobu 55 minut o průtoku 0,01 ml/min. Eluované peptidy byly separovány na koloně s obrácenou fází (Luna® Omega o velikosti částic 3 μm Polar C18, velikost pórů 100 Å (0,3x150 mm) vyhřívanou na 50 °C. Gradient je znázorněn v tabulce 5.

Tabulka 5: Gradient mobilních fází při LC-MS analýze

Čas [min]	Fáze A [%]	Fáze B [%]	Průtok [ml/min]
0	95	5	0,01
1	95	5	0,01
5	90	10	0,01
35	65	35	0,01
40	5	95	0,01
45	5	95	0,01
46	95	5	0,01
60	95	5	0,01

Kapalinová chromatografie byla propojena s hmotnostním spektrometrem solarix FT-ICR s 15T supravodivým magnetem. Eluované peptidy byly analyzovány v pozitivním modu s akvizicí 1 milion databodů v rozsahu 250-2500 m/z, kdy výsledná spektra byla pořízena průměrováním 4 spekter jdoucích po sobě při akumulaci iontů v kolizní cele 0,4 s. Fragmentační data byla získána pomocí datově nezávislého měření kotvící m/z (z anglického lock mass; 922.0098) s isolačním oknem ± 500 Da při kolizní energii 15eV a akumulaci 0,2 s.

4.12 Vyhodnocení dat

4.12.1 LC-MS analýza aminokyselin po radikálovém značení Togniho činidly

Surová data z LC-MS analýzy byla zpracována pomocí programu DataAnalysis 5.0 (Bruker Daltonics), konkrétně byla vyextrahována MS spektra odpovídající m/z jednotlivých aminokyselin a jejich modifikací pomocí Togniho činidel.

4.12.2 Data pořízená s využitím top-down hmotnostní spektrometrie

Surová data byla analyzována v programu DataAnalysis 5.0 (Bruker Daltonics), kde byly dekonvulována pomocí algoritmů SNAP 2.0 a APEX. Tyto data byla následně vyexportována v txt formátu pro software Ms2Links od M. Young⁷⁵. Pomocí softwaru Ms2links byla data procesována s chybou 5 ppm pro prekurzorový ion a 0,5 Da pro vzniklé fragmenty. Správnost automatického vyhodnocení byla ověřena manuálně zpětně v DataAnalysis 5.0. Vizualizace modifikovaných aminokyselin na proteinu byla provedena pomocí programu PyMol (Schrödinger, USA).

4.12.3 Data pořízená s využitím bottom-up hmotnostní spektrometrie

Surová data z LC-MS/MS analýzy byla zpracována pomocí programu DataAnalysis 5.0 (Bruker Daltonics). Po zpracování byla data vyexportována ve formátu mgf a procesována programem MASCOT (Matrix Science, Velká Británie) s následujícími parametry: proteasa trypsin s maximálně třemi možnými chybami štěpení, variabilní modifikace – oxidace methioninu a fluoralkylové modifikace aromatických aminokyselin, chyba měření pro prekurzorový ion 5 ppm a chyba měření pro vzniklé fragmenty 0,5 Da. Po vyhodnocení programem MASCOT byly výsledné hodnoty molekulových hmotností extrahovány v programu DataAnalysis 5.0 (Bruker Daltonics) a odečteny intenzity jednotlivých monoisotopických hmotností příslušných aminokyselin. Kvantifikace dat byla prováděna podle rovnice (17)⁵⁴.

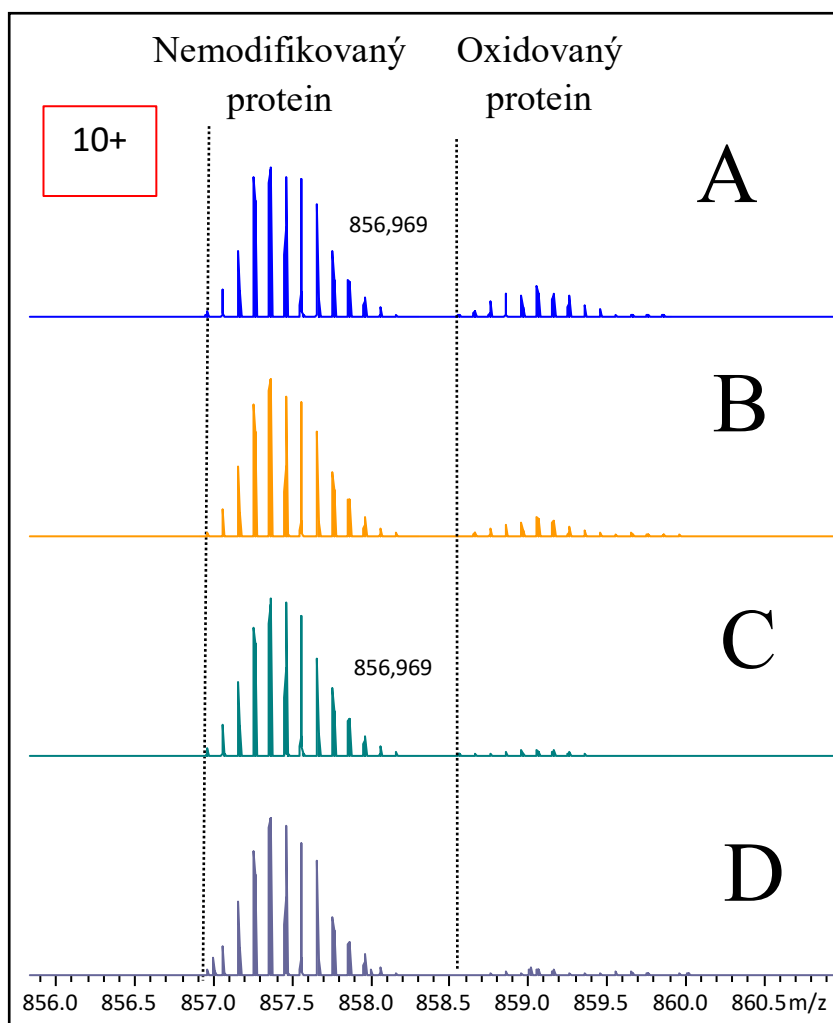
$$[X] = \frac{I_{\text{monoistopické mol. hmotnosti modifikované AK}}}{I_{\text{monoisotop } M_W \text{ všech modifikovaných AK v daném peptidu}} + I_{\text{monoistop } M_W \text{ nemodmod AK}}} \quad (17)$$

kde, [X] je množství modifikované aminokyseliny a *I* značí intenzity MS spekter různých modifikovaných a nemodifikovaných aminokyselin. Následná statistika byla provedena v programu Prism 8.0 (GraphPad Software, Inc.). Jako statistické údaje byly zvoleny: směrodatná odchylka, průměr a správnost výsledků, která je charakterizována P-hodnotou a T-testem. Vizualizace modifikovaných aminokyselin na proteinu, byla provedena pomocí programu PyMol (Schrödinger, USA).

5 Výsledky

5.1 Optimalizace přípravy značícího pufru

Cílem optimalizace bylo potlačení oxidace proteinu kyslíkem. Výsledná MS spektra jsou znázorněna na obrázku 27, kde je zobrazen protein ubiquitin v nábojovém stavu 10^+ . Spektra A-D znázorňují různé přístupy přípravy značícího pufru.

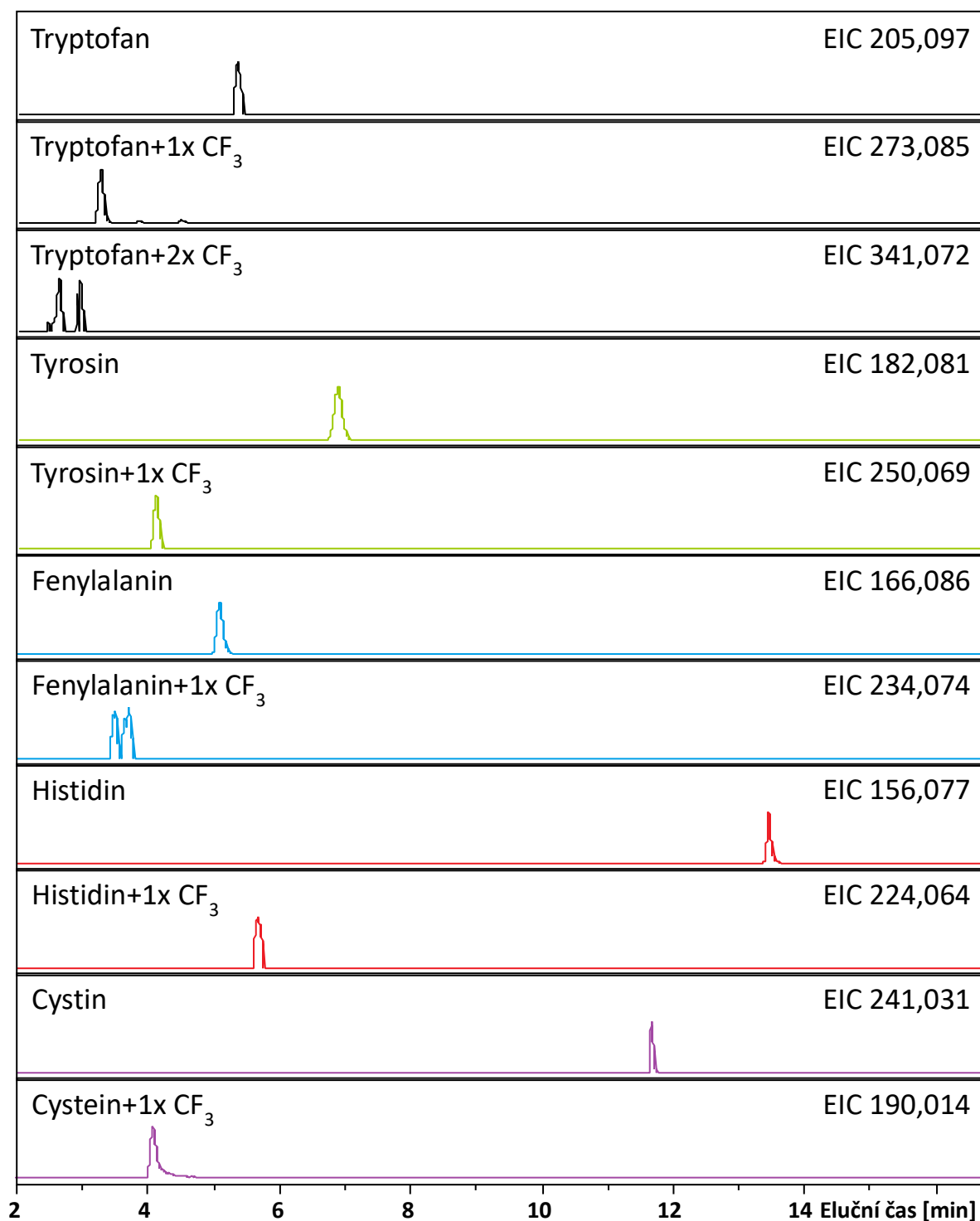


Obrázek 27: Výsledná MS spektra pro optimalizace přípravy značícího pufru. Ve spektrech jsou zobrazeny dvě populace proteinu UBQ, první náleží nemodifikovanému UBQ a druhá 1x oxidovanému proteinu UBQ. A – protein UBQ byl rozpuštěn ve starém značícím pufru uchovávaného několik dní v lednici. B – protein UBQ byl rozpuštěn v čerstvě připraveném značícím pufru bez dodatečného probublávání. C – protein UBQ byl rozpuštěn v probublaném značícím pufru. D – protein UBQ byl rozpuštěn v probublaném, odplyněném a znovu probublaném značícím pufru.

Po přípravě nového pufru, došlo k poklesu oxidace. Následné sycení heliem výrazně potlačilo oxidaci proteinu. V případě kompletního odplynění pufru a následného sycení, byl pokles nejvýraznější.

5.2 Analýza aminokyselin po radikálovém značení Togniho činidly

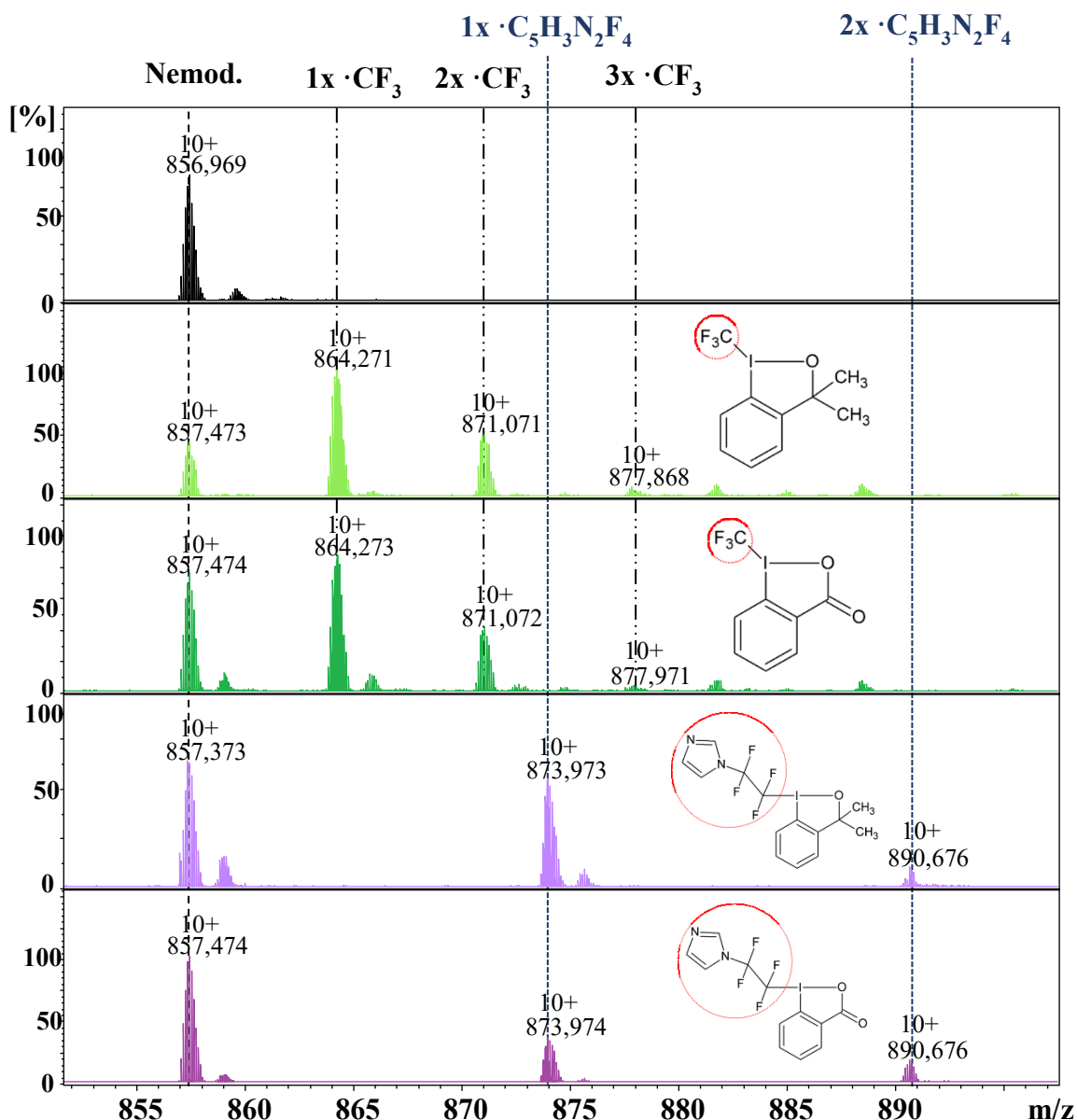
Po označení směsi aminokyselin s cystinem byla směs podrobena analýze pomocí LC-MS. Z výsledné chromatografické stopy byly pomocí software DataAnalysis 5.0 extrahovány iontové chromatogramy pro všechny aminokyseliny a jejich jednou a dvakrát modifikované varianty. Ze získaných naměřených dat vyplývá, že z 20 přítomných aminokyselin bylo modifikováno pouze pět. Aromatické aminokyseliny (tryptofan, tyrosin, fenylalanin a histidin) a cystin s thiolovou skupinou ve svém postranním řetězci. Tryptofan byl modifikován dvakrát. Analýza byla provedena se všemi čtyřmi Togniho činidly a poskytla stejné výsledky. Výsledné chromatogramy pro modifikované aminokyseliny pomocí kyselého činidla (1-(trifluoromethyl)-1,2-benziodoxol-3(1H)-on) jsou znázorněny na obrázku 28 str. 51.



Obrázek 28: Výsledné extrahované iontové chromatogramy pro aminokyseliny, které byly radikálově označeny pomocí kyselého Togniho činidla (1-(trifluoromethyl)-1,2-benziodoxol-3(1H)-on). Pomocí Togniho činidel bylo označeno pět aminokyselin: tryptofan, tyrosin, fenylalanin, histidin a cystein. Tryptofan (černě znázorněný chromatogram) byl modifikován jako jediný dvakrát. Ostatní aminokyseliny nebyly modifikovány viz příloha 1.

5.3 Radikálové značení ubiquitinu Togniho činidly

Prvním modelovým proteinem byl ubiquitin. Po třiceti sekundovém radikálovém značení všemi typy Togniho činidel byly vzorky odsoleny a charakterizovány hmotnostní spektrometrií v pozitivním modu. Výsledná spektra pořízená na hmotnostním spektrometru jsou znázorněna na obrázku 29.



Obrázek 29: Výsledná spektra nábojového stavu 10^+ ubiquitinu před a po radikálovém značení Togniho činidly pořízená hmotnostní spektrometrií (FT-ICR). Černé spektrum znázorňuje kontrolu, což je UBQ, který byl použit pro radikálové značení. Zelená spektra znázorňují výsledek reakce UBQ s CF_3 radikály vzniklými z Togniho činidel. Světle zelená pro alkoholové činidlo a tmavě zelená pro alkoholové činidlo. Hmotnostní inkrement odpovídá teoretické hodnotě 66,978 Da. Fialová spektra znázorňují modifikace UBQ s $\text{C}_5\text{H}_3\text{N}_2\text{F}_4$ radikály. Světle fialová odpovídá imidazolovému alkoholovému činidlu a tmavě fialová odpovídá imidazolovému kyselému činidlu. Hmotnostní inkrement pro tyto radikály odpovídá teoretické hodnotě 166,015 Da.

Ubiquitin se podařilo úspěšně modifikovat všemi čtyřmi námi testovanými činidly. V případě trifluormethylových činidel (kyselé a alkoholové činidlo) byl protein UBQ modifikován 3x a v případě imidazol-tetrafluorethylových činidel byl protein UBQ modifikován pouze 2x. Nábojové stavy 9-12+ pro nemodifikovaný, 1x modifikovaný a 2x modifikovaný byly izolovány a následně podrobeny fragmentační (Top-down) analýze.

5.4 „Top down“ analýza ubiquitinu po radikálovém značení Togniho činidly

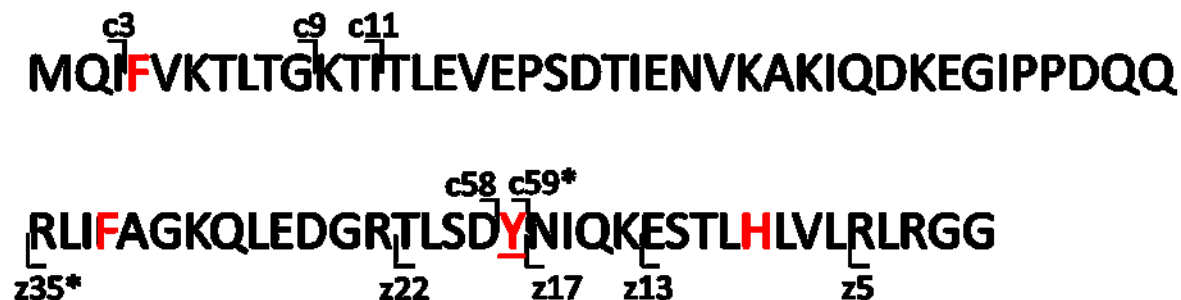
V prvním případě fragmentační analýza poskytla několik iontů, z toho u iontů c59 a z35 byl nalezen iont s modifikací i bez modifikace. Tabulka iontů a jejich molekulových hmotností je znázorněna pod číslem 6.

Tabulka 6: Přehled iontů poskytnutých fragmentační analýzou technikou CID-ECD

	UBQ Hmota iontu / Chyba [ppm]	UBQ + ·CF ₃ Hmota iontu / Chyba [ppm]	UBQ + ·CF ₃ Hmota iontu / Chyba [ppm]	UBQ + ·C ₅ H ₃ N ₂ F ₄ Hmota iontu / Chyba [ppm]	UBQ + ·C ₅ H ₃ N ₂ F ₄ Hmota iontu / Chyba [ppm]
c2	277,133 / 1,4	X	X	X	X
c3	390,217 / 0,8	X	X	X	X
c9	1079,628 / 0,2	X	X	X	X
c11	1264,745 / 0,4	X	X	X	X
c58	6481,464 / 0,2	X	X	X	X
c59*	6644,529 / 0,1	6711,513 / 0,9	6711,509 / 0,8	6810,540 / 1,6	6810,540 / 1,6
z5	542,329 / 0,8	X	X	X	X
z13	1434,830 / 0,3	X	X	X	X
z17	1918,112 / 0,0	X	X	X	X
z22	2497,365 / 0,0	X	X	X	X
z35*	3981,191 / 0,1	4048,174 / 1,1	4048,174 / 1,1	4147,203 / 1,4	4147,203 / 1,4

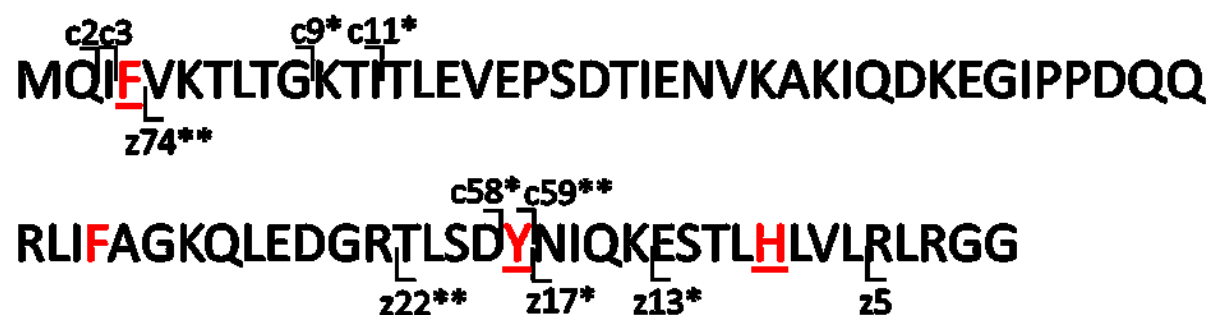
CID-ECD fragmentační analýza poskytla informaci, že modifikovaná aminokyselina se nachází v peptidu iontu c59 a z35. Po znázornění iontů do sekvence UBQ, která je

znázorněna na obrázku 30, nebylo možné s jistotou určit, která aminokyselina modifikaci obsahuje, a proto byla provedena analýza s jiným typem fragmentace.



Obrázek 30: Sekvence ubiquitinu zvýrazněnými ionty po fragmentační analýze pomocí kombinace CID-ECD. Ionty s hvězdičkou znázorňují ionty, které jsou modifikovány pomocí radikálů vzniklých z Togniho činidel a ionty bez hvězdičky jsou nemodifikované ionty. Červenou barvou jsou znázorněné aminokyseliny, které mohou být označeny pomocí radikálů. V tomto případě analýza určila s nejvyšší pravděpodobností jako modifikovanou aminokyselinu tyrosin na pozici 59, který je potvrzený.

V případě ETD fragmentace, což je fragmentace výhradně pomocí elektronu⁶⁶, bylo detekováno více iontů, které nesly informaci o modifikovaných peptidech. Přehled iontů, které obsahovaly pro identifikace nejdůležitější informaci, což znamená ionty, které dokazují přítomnost radikálové značky na jednotlivých residuech, jsou znázorněny v tabulce 7. Tyto ionty byly znázorněny do sekvence UBI, které je znázorněna obrázkem 31.

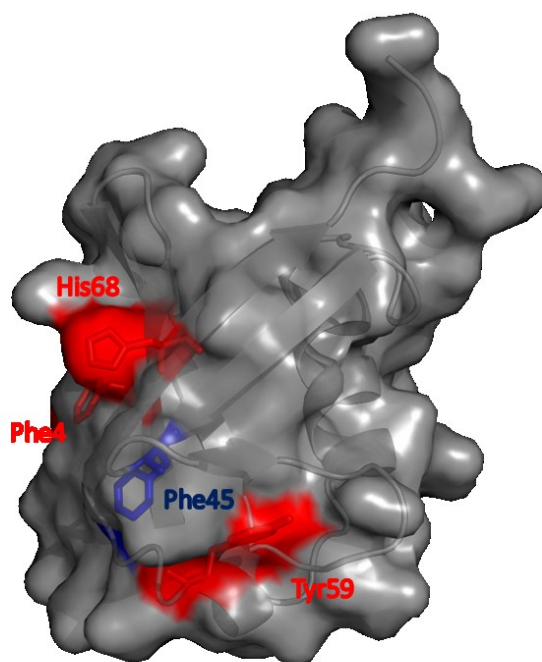


Obrázek 31: Sekvence ubiquitinu se zvýrazněnými ionty po fragmentační analýze pomocí ETD. Ionty s hvězdičkou znázorňují ionty, které jsou modifikovány pomocí radikálů vzniklých z Togniho činidel, ionty s dvěma hvězdičkami znázorňují peptidy, které jsou 2x modifikované a ionty bez hvězdičky jsou nemodifikované ionty. Červenou barvou jsou znázorněné aminokyseliny, které mohou být označeny pomocí radikálů. ETD analýza prokázala modifikaci na všech aromatických residuech s výjimkou fenylalaninu na pozici 45, který není potvrzený.

Tabulka 7: Přehled iontů poskytnutých fragmentační analýzou pomocí ETD

	UBQ Hmota iontu / Chyba [ppm]	UBQ + $\cdot\text{CF}_3$ Hmota iontu / Chyba [ppm]	UBQ + $\cdot\text{CF}_3$ Hmota iontu / Chyba [ppm]	UBQ + $\cdot\text{C}_5\text{H}_3\text{N}_2\text{F}_4$ Hmota iontu / Chyba [ppm]	UBQ + $\cdot\text{C}_5\text{H}_3\text{N}_2\text{F}_4$ Hmota iontu / Chyba [ppm]
c2	277,133 / 1,4	X	X	X	X
c3	390,217 / 0,8	X	X	X	X
c9*	1079,628 / 0,2	1146,614 / 0,6	1146,616 / 0,9	1245,644 / 0,0	1245,644 / 0,2
c11*	1264,745 / 0,4	1331,732 / 0,8	1331,732 / 0,8	1430,760 / 0,2	1430,760 / 0,1
c58*	6481,464 / 0,2	6548,452 / 0,7	6548,459 / 0,5	6647,477 / 0,9	6647,477 / 0,7
c59**	6644,530 / 0,1	6778,498 / 1,9	6778,498 / 1,8	6976,605 / 2,0	6976,605 / 2,6
z5	542,329 / 0,8	X	X	X	X
z13*	1434,830 / 0,3	1501,820 / 1,1	1501,816 / 0,6	1600,846 / 0,2	1600,846 / 0,2
z17*	1918,112 / 0,0	1985,107 / 1,7	1985,104 / 1,4	2084,126 / 0,1	2084,127 / 0,0
z22**	2497,366 / 0,0	2631,334 / 0,3	2631,334 / 0,4	2829,397 / 0,1	2829,396 / 0,3
z74**	8285,506 / 0,1	8419,528 / 0,1	8419,528 / 0,2	8617,537 / 0,1	8617,537 / 0,1

ETD analýza odhalila modifikace na všech aromatických aminokyselinách, kromě fenylalaninu na pozici 45. Modifikované aminokyseliny, které poskytly obě fragmentační analýzy, byly znázorněny do struktury UBQ s PDB kódem 1UBQ⁷⁶. Vizualizace byla provedena pomocí programu PyMol a je znázorněna na obrázku 32 str. 56.

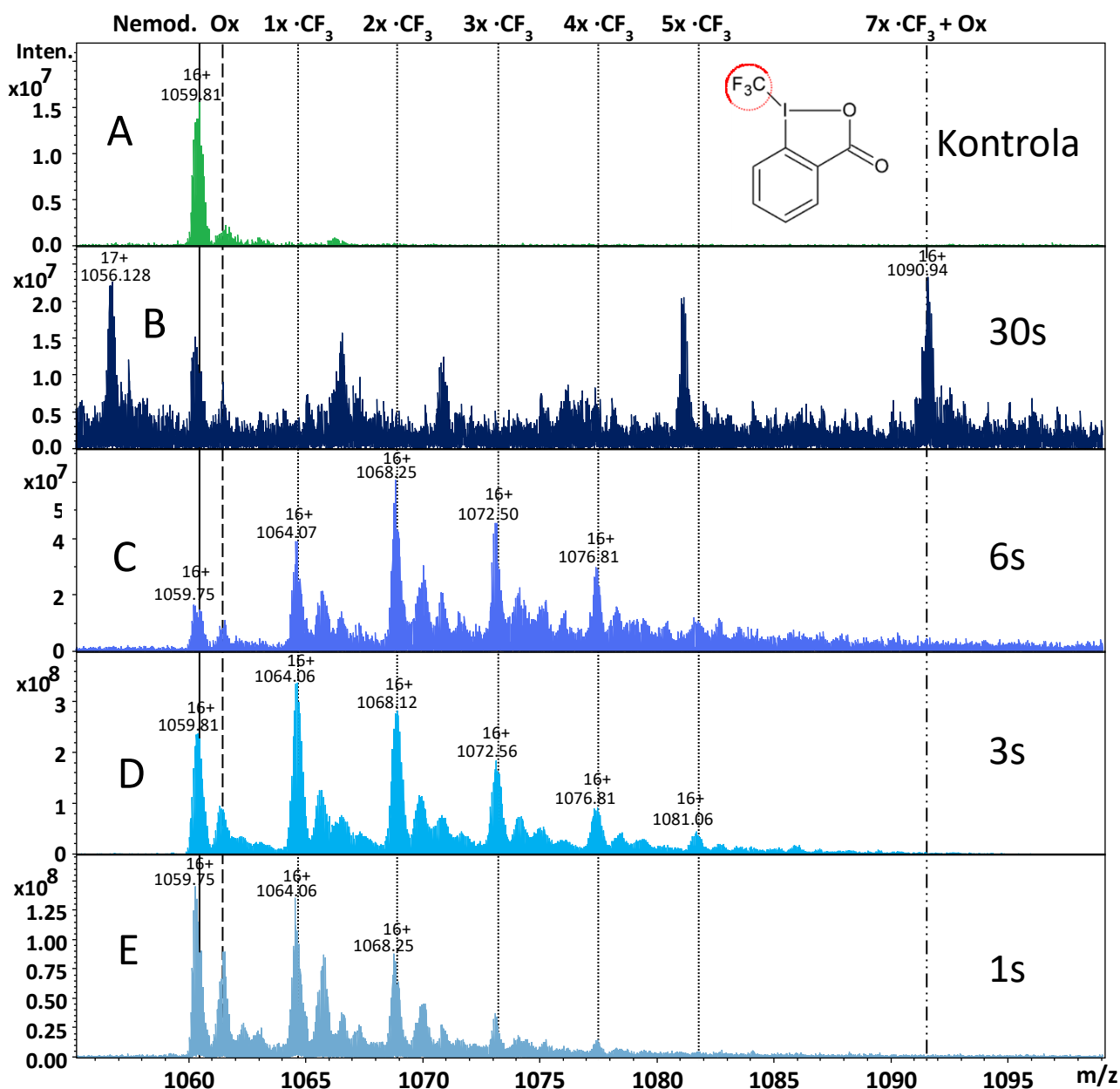


Obrázek 32: Struktura ubiquitinu (1UBQ⁷⁶) se zvýrazněnými aromatickými residui. Červeně znázorněné jsou modifikovaná aromatická residua a modře je znázorněn fenylalanin 45, který nebyl modifikovaný pomocí radikálů vzniklých z Togniho činidel.

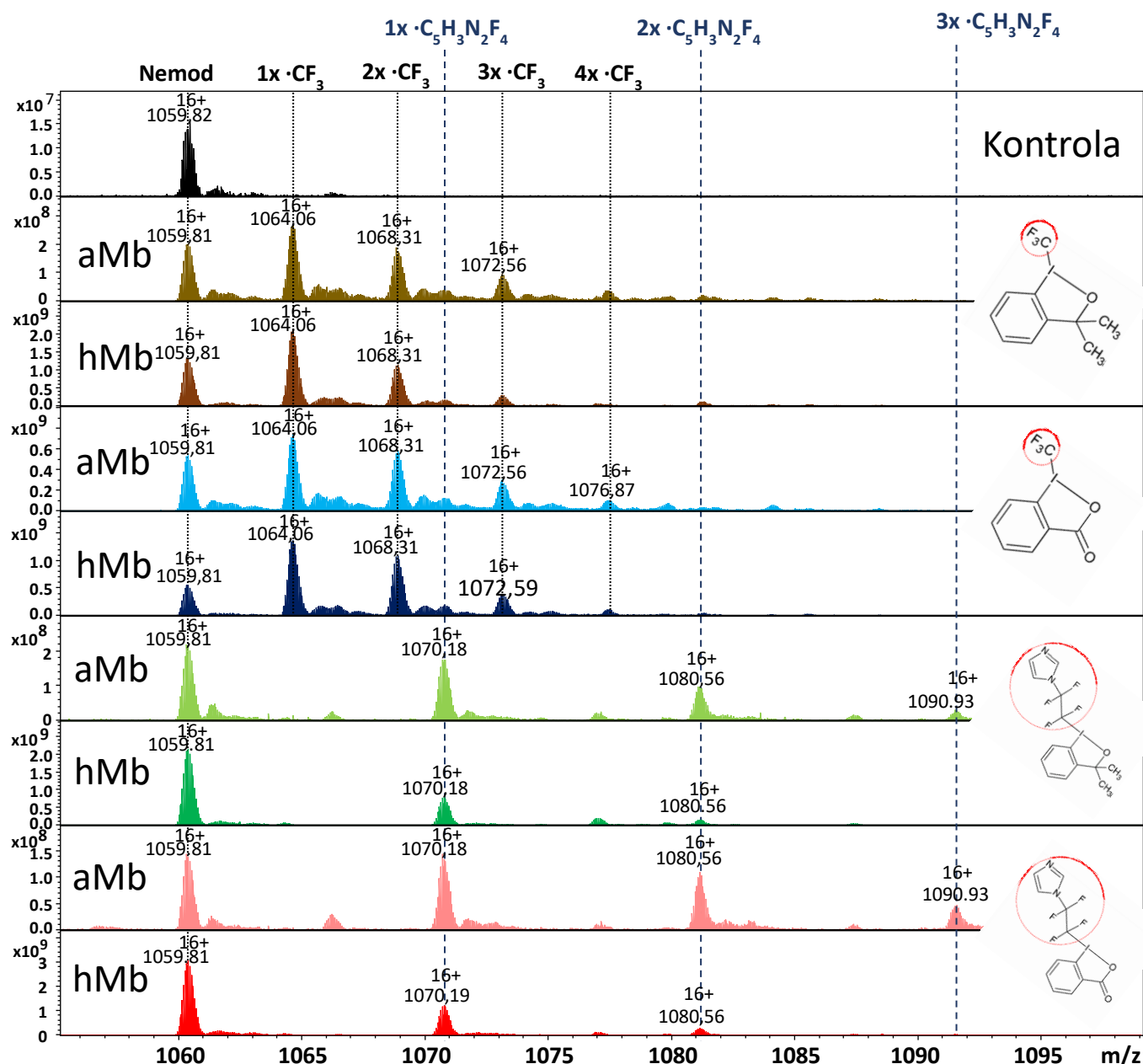
5.5 Radikálové značení apo- a holoformy myoglobinu

Jako druhý protein byl zvolen myoglobin, přesněji jeho holoforma, obsahující hem a apoforma, která hem neobsahuje. Cílem tohoto značení bylo zjištění, zdali je možné lokalizovat strukturní změny indukované odstraněním molekuly hemu. Pro sledování časové závislosti reakce byla zvolena apoforma myoglobinu a kyselé činidlo (1-(trifluoromethyl)-1,2-benziodoxol-3(1H)-on) a byl sestaven průtokový reaktor (obr. 26 str. 46). Reakce byla provedena při čtyřech různých časových úsecích a výsledky značení jsou znázorněny na obrázku 33 str. 57. V případě třicetisekundové reakce byla detekována isotopová obálka odpovídající sedmi modifikacím proteinu aMb trifluormethylovými radikály a jedné oxidaci. Při využití průtokového reaktoru pro reakce s rychlým průběhem (6, 3, 1s) je výsledné spektrum výrazně přehlednější a dochází maximálně k pěti modifikacím proteinu trifluormethylovými radikály, dochází ovšem i k oxidaci proteinu ve všech případech.

Pro sledování strukturních změn mezi aMb a hMb byly jako optimální časové podmínky zvoleny tři sekundy a pro tento čas byly provedeny reakce s oběma formami proteinu a se všemi výše uvedenými Togniho činidly. Výsledná spektra po označení a odsolení proteinu jsou znázorněna na obrázku 34 str. 58.



Obrázek 33: Výsledná MS spektra pro časovou optimalizaci apoformy myoglobinu pro nábojový stav 16^+ . (A) - Zeleně znázorněné spektrum zobrazuje kontrolu, tedy pouze odsolený protein aMb. (B) - Tmavě modré spektrum znázorňuje 30s reakci aMb s Togniho činidlem. V tomto případě je ve spektru mnoho isotopových obálek a interpretace je velmi složitá. (C) - Modré spektrum znázorňuje 6s reakci, kde je patrné, že dochází k až 5 modifikacím aMb pomocí trifluormethylových radikálů, přičemž nejintenzivnější isotopovou obálkou je 2x modifikovaný protein. (D) - Azurové spektrum znázorňuje 3s reakci. Toto spektrum je mnohem více přehlednější než dvě předchozí a dochází zde k pěti modifikacím proteinu, kde nejintenzivnější isotopická obálka je v případě 1x modifikovaného proteinu. (E) - Světle modré spektrum znázorňuje 1s reakci, zde dochází k úbytku modifikací pomocí trifluormethylových radikálů, ale narůstá zde příspěvek oxidace proteinu.

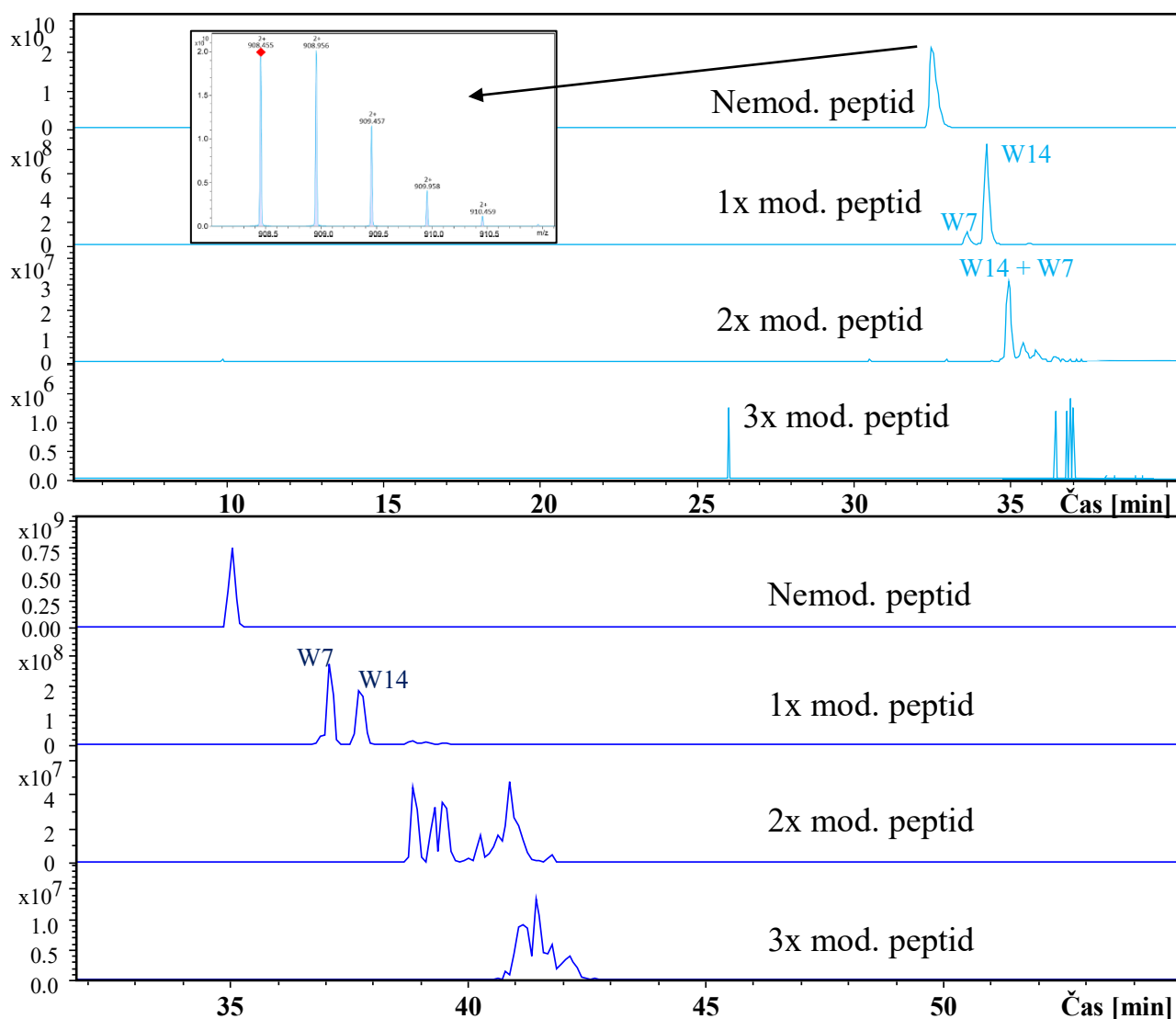


Obrázek 34: Výsledná MS spektra pro reakci apo- a holoformy myoglobinu se všemi využívanými Togniho činidly pro nábojový stav 16⁺. Černé spektrum znázorňuje kontrolu, hnědá spektra znázorňují alkoholové činidlo, modrá spektra znázorňují kyselé činidlo, zelená spektra znázorňují imidazolové-alkoholové činidlo a červená spektra znázorňují imidazolové-kyselé činidlo. Tmavší odstín dané barvy (hMb) vždy znázorňuje holoformu myoglobinu. U holoformy dochází k poklesu množství a intenzit daných modifikací. Tento trend je mnohem výraznější u Imidazolových činidel. Pro kyselé a alkoholové činidlo je teoretická hodnota hmotnostního posunu 66,978 Da a pro imidazolové kyselé alkoholové činidlo 166,015 Da.

Z obrázku 34 vyplývá, že dochází k rozdílnému značení proteinu v jeho apo- a holoformě. Pro zjištění, na jakých residuech dochází ke změně, byl proveden „bottom up“ experiment, tedy proteolytické štěpení proteinu a následná relativní kvantifikace modifikovaných peptidů. Z obrázku 34 je rovněž patrné, že při použití správně připraveného pufru dochází k výraznému poklesu oxidace proteinu.

5.6 Proteolytická analýza a kvantifikace modifikovaných residuů apo- a holoformy myoglobinu

Pro proteolytickou analýzu byly vybrány dva časové body reakce 3 a 30 sekund a všechny vzorky byly připraveny v triplicátech pro následné statistické vyhodnocení. Po LC-MS/MS analýze byly ze surových dat extrahovány iontové chromatogramy pro všechny peptidy a jejich modifikované formy vzniklé proteolytickým štěpením trypsinem. Pokrytí sekvence proteinu peptidu bylo 100 %. Příklad extrahovaného iontového chromatogramu pro peptid 1-16 je znázorněn na obrázku 35.

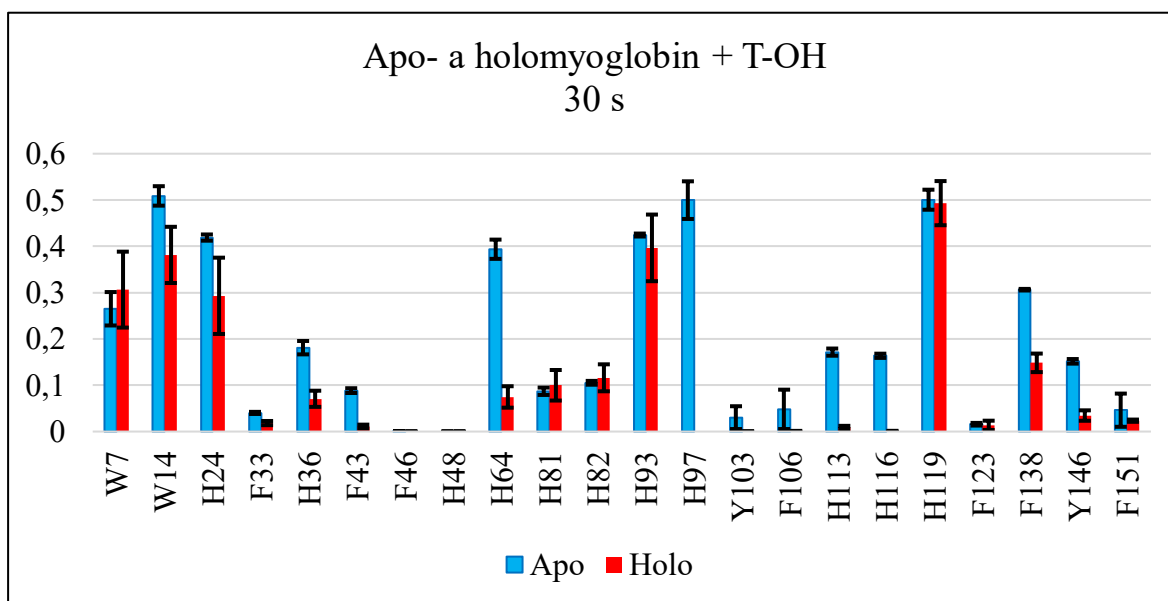


Obrázek 35: Příklad extrahovaných iontových chromatogramů pro peptid 1-16. Světle modré chromatogramy znázorňují 3s reakci apomyoglobinu s Togniho činidly a tmavě modré chromatogramy znázorňují 30s reakce. Peptid 1-16 obsahuje dvě aromatická residua tryptofan 7 a 14, pomocí MS/MS analýzy byly jednotlivé píky v každém chromatogramu přiřazeny jednotlivým aminokyselinám. Čtyři spektra znázorňují nemodifikovaný, jednou modifikovaný, dvakrát modifikovaný a třikrát modifikovaný peptid. Po přiřazení byly z MS spektra (spektrum v levém horním rohu obrázku) odečteny intenzity monoisotopu (označen červenou tečkou) a kvantifikovány.

Po MS/MS analýze (spektra zobrazené v příloze 2 pro alkoholové činidlo a 3 imidazolové alkoholové činidlo) byly vyextrahovány iontové chromatogramy, přiřazeny jednotlivým aminokyselinám. Monoistopické intenzity hmot vzniklých peptidů byly kvantifikovány v holo i apo formě proteinu pro všechna činidla a oba časy. V případě tří sekundové reakce byly provedeny statistické výpočty T-testu a P-hodnoty. Na základě statistických výpočtů byly aminokyseliny vizualizovány do struktury myoglobinu s PDB kódem 1WLA⁷⁷. Výsledné kvantifikace a vizualizované struktury myoglobinu jsou znázorněny níže v samostatných podkapitolách pro každé Togniho činidlo.

5.6.1 Kvantifikace aromatických aminokyselin apo- a holomyoglobinu pro alkoholové činidlo

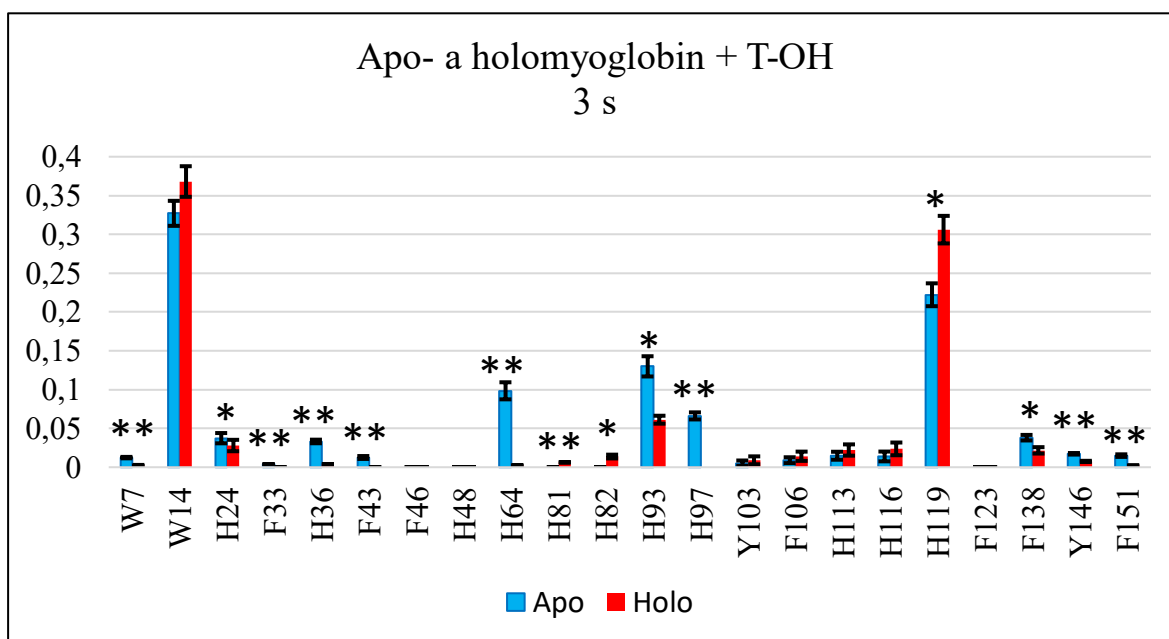
Výsledek kvantifikace aminokyselin pro reakci apo- a holomyoglobinu alkoholovým činidlem je znázorněn na grafu 2 str. 60 pro třicet sekundovou reakci a na grafu 3 str. 61 pro tři sekundovou reakci.



Graf 2: Kvantifikace aromatických aminokyselin myoglobinu po reakci s alkoholovým činidlem pro 30 sekundovou reakci. Modré sloupce znázorňují modifikované množství v apo-formě myoglobinu a červené v holo formě myoglobinu. Největší rozdíly jsou u aminokyselin: H64, H97, Y103, F106, H113, H116 a Y146, kde dochází k snížení množství modifikace v holo- formě myoglobinu.

Při kvantifikaci aminokyselin po třicet sekundové reakci u většiny aromatických aminokyselin dochází ke změnám v množství modifikací mezi apo- a holoformou myoglobinu. Ty nejvýraznější se projeví u aminokyselin histidinu v pozici 64 a histidinu

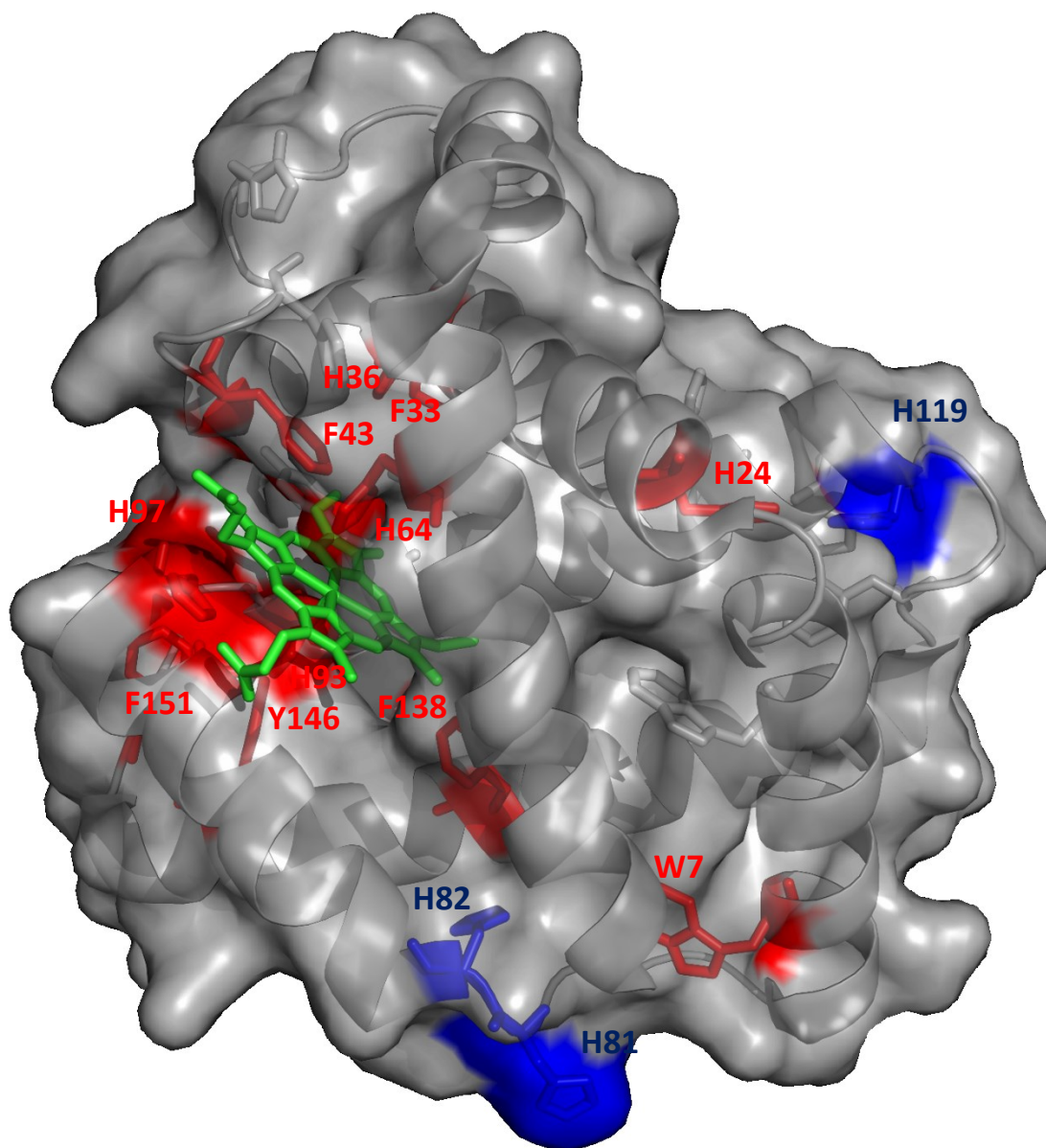
v pozici 97. K dalším změnám dochází v oblasti od aminokyselin Y103 do H116. Ve většině případů dochází k úbytku modifikací v holoformě proteinu, kromě aminokyselin histidin na pozicích 81 a 82, kde je mírný nárůst pro apoformu myoglobinu. Některé výsledky je nutno brát s opatrností s ohledem na velkou chybovost mezi jednotlivými vzorky. V případě 3s reakce jsou výsledky kvantifikace znázorněny na grafu 3.



Graf 3: Kvantifikace modifikací postranních řetězců aromatických aminokyselin myoglobinu po reakci s alkoholovým činidlem pro dobu 3 sekund. Modré sloupce znázorňují modifikované množství v apo- formě myoglobinu a červené v holo- formě myoglobinu. Hvězdičky znázorňují správnost výsledků, a jestli se daná změna mezi apo- a holo- formou dá posuzovat jako pravdivá a důležitá. Podmínky pro počet hvězdiček jsou udávány statistickou P-hodnotou (***) - $P < 0,005$; ** - $P < 0,01$; * - $P < 0,05$). Grafy (hodnoty), které nejsou označeny hvězdičkou, jsou považovány za statisticky nevýznamné. V tomto případě jsou největší změny v poměru kvantifikací u aminokyselin H36, H64, H93, H97, kde dochází k úbytku modifikace v holoformě myoglobinu a u histidinu na pozici 119 je největší změna kdy dochází k nárůstu modifikace v holoformě myoglobinu.

Při reakci tří sekund je nejvíce modifikován tryptofan v pozici 14, kde nedochází k statisticky významným změnám, nicméně převažuje zde modifikace v holoformě a histidin na pozici 119, který je více modifikován v holoformě myoglobinu. Naopak nedochází k modifikaci aminokyselin F46, H48 a F123 a velmi málo dochází k modifikování aminokyselin H81, H82, Y103 a F106. Ostatní aminokyseliny jsou modifikovány přibližně do 10%. K nejvýraznějším změnám dochází u aminokyselin H36, H64, H93 a H97. Aminokyseliny, které byly označeny jako statisticky významné, byly znázorněny ve struktuře poskytnuté pomocí rentgeno-strukturní analýzou⁷⁷. Struktura myoglobinu se zvýrazněnými statisticky významnými residui je znázorněna na obrázku 36, kde červeně

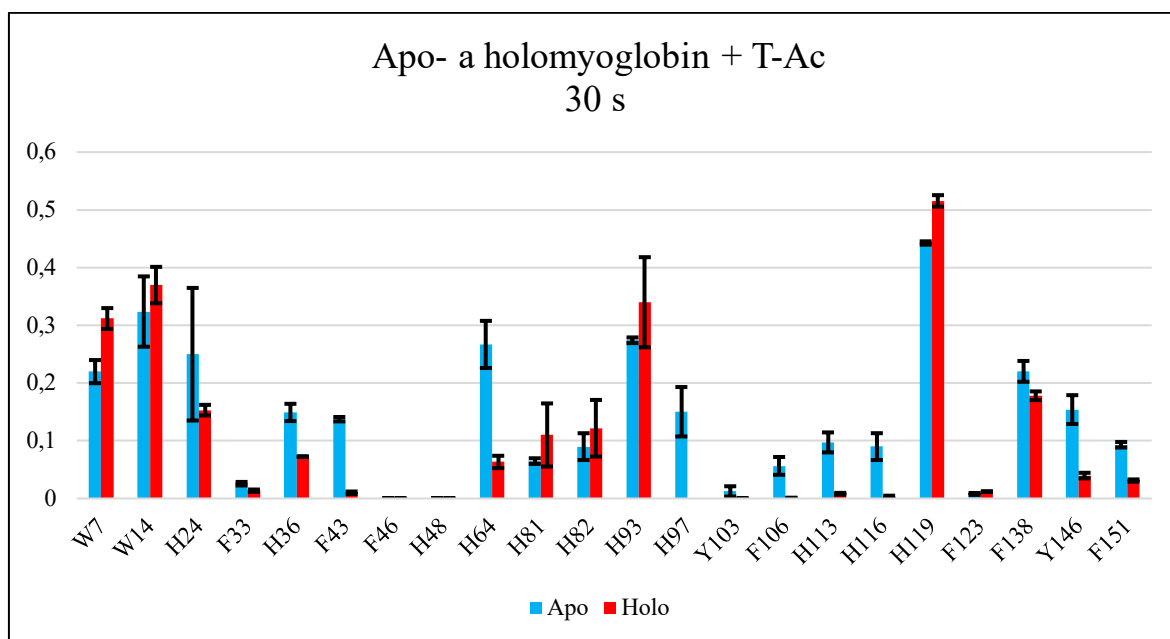
obarvené aromatické aminokyseliny znázorňují úbytek modifikace v holoformě a modré residua znázorňují nárůst modifikace v holoformě.



Obrázek 36: Strukturní zobrazení statisticky významných modifikovaných aromatických aminokyselin myoglobinu pomocí alkoholového činidla (PDB kód 1WLA⁷⁷). Červeně znázorněná residua značí úbytek modifikace v holoformě a modře vyznačené znázorňují nárůst modifikace v holoformě. Neobarvené aromatická residua jsou statisticky nevýznamná. Zeleně je znázorněn hem.

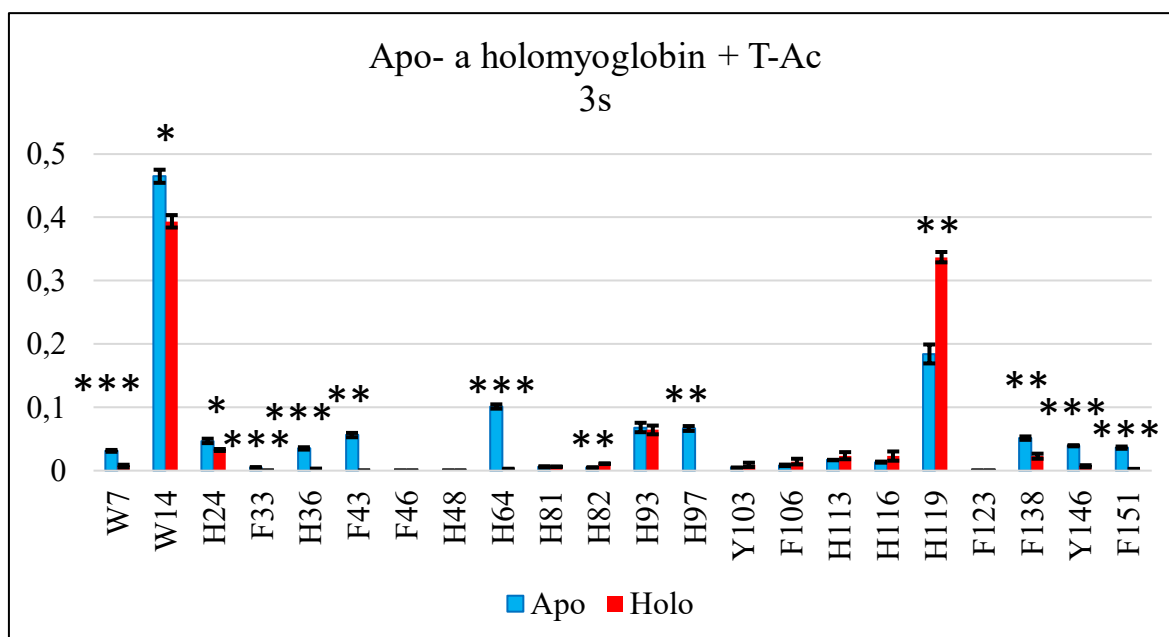
5.6.2 Kvantifikace aromatických aminokyselin apo- a holomyoglobinu pro kyselé činidlo

Výsledek kvantifikace aminokyselin pro reakci apo- a holomyoglobinu kyselým činidlem je znázorněn na grafu 4 str. 63 pro třicet sekundovou reakci a na grafu 5 str. 64 pro tři sekundovou reakci.



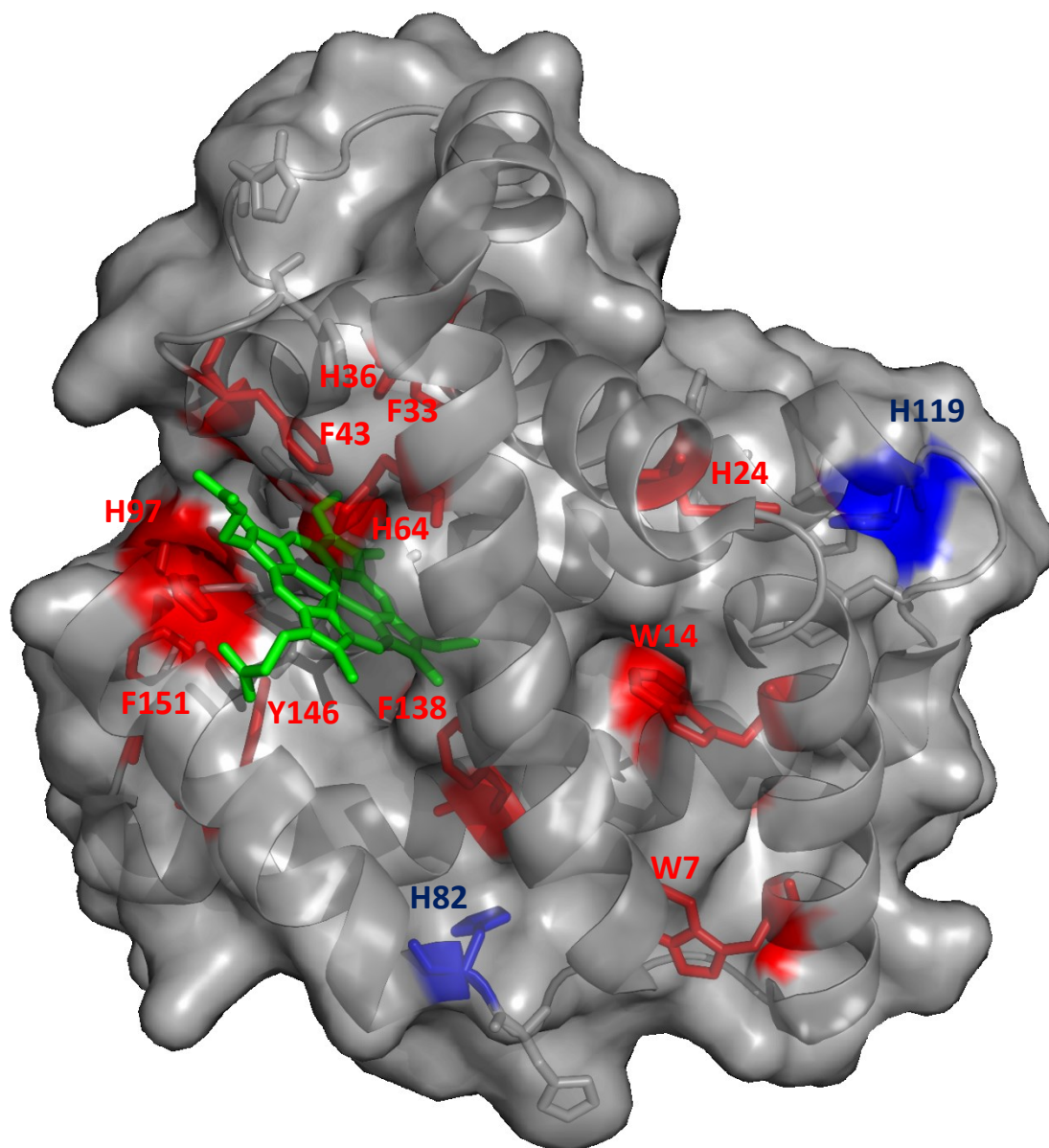
Graf 4: Kvantifikace aromatických aminokyselin myoglobinu pro reakci s kyselým činidlem pro 30 sekundovou reakci. Modré sloupce znázorňují modifikované množství v apo- formě myoglobinu a červené v holoformě myoglobinu. Největší rozdíly jsou u aminokyselin: H36, F43, H64, H97, F106, H113, H116, Y146 a F151, kde dochází ke snížení množství modifikace v holoformě myoglobinu. V případě H119 a W7 dochází k nárůstu modifikace v holoformě myoglobinu.

V případě 30 sekundové reakce kyselého Togniho činidla dochází k největší změně v oblasti H36 – F43 dále u histidinů na pozicích 64 a 93, oblasti aminokyselin od F106 po H116 a posledním výraznějším úbytkem dochází na C-konci proteinu u aminokyselin Y146 a F151. U histidinu v pozici 119 a tryptofanu v pozici 7 dochází k nárůstu modifikace v holoformě proteinu.



Graf 5: Kvantifikace aromatických aminokyselin myoglobinu pro reakci s kyselým činidlem pro 3 sekundovou reakci. Modré sloupce znázorňují modifikované množství v apo- formě myoglobinu a červené v holo- formě myoglobinu. Hvězdičky znázorňují správnost výsledků a jestli se daná změna mezi apo- a holo- formou dá posuzovat jako pravdivá a důležitá. Podmínky pro počet hvězdiček jsou udávány statistickou P-hodnotou (*** - $P < 0,005$; ** - $P < 0,01$; * - $P < 0,05$). Sloupce (hodnoty), které nejsou označeny hvězdičkou jsou považovány za statisticky nevýznamné a nelze s nimi dále pracovat. V tomto případě jsou největší změny v poměru kvantifikací u aminokyselin H36, F43, H64, H97, Y146, F151, kde dochází k úbytku modifikace v holoformě myoglobinu a u histidinu na pozici 119 dochází k nárůstu modifikace v holoformě myoglobinu.

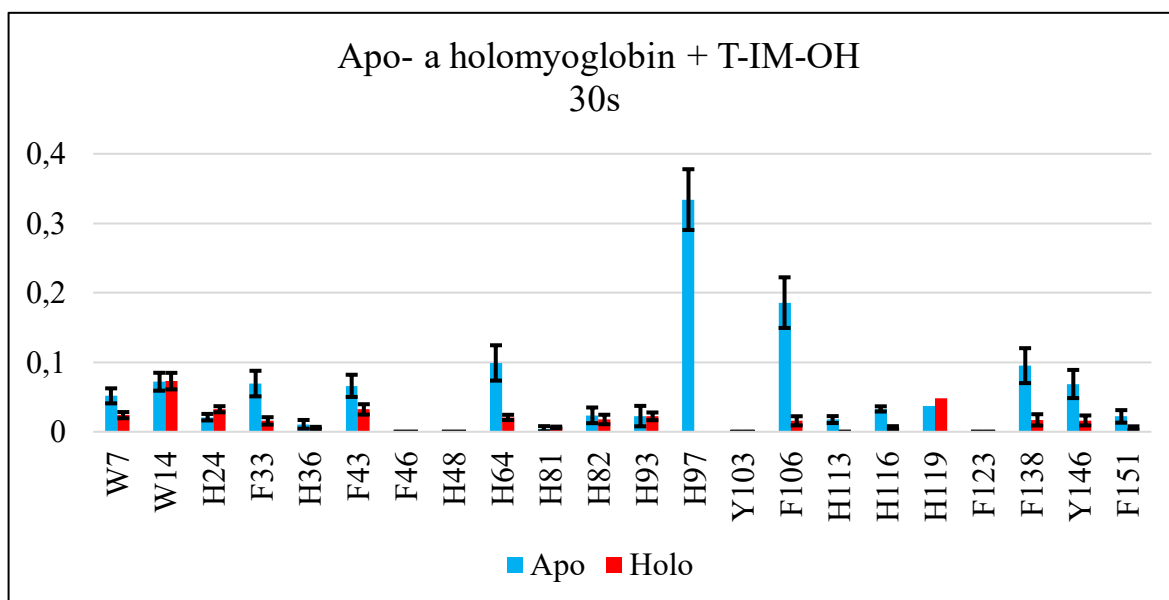
Při reakci trvající tři sekundy s kyselým Togniho činidlem je nejvíce modifikován tryptofan v pozici 14, kde převažuje modifikace v apoformě. Druhá nejvíce modifikovaná aminokyselina je histidin v pozici 119, kde k vyššímu nárůstu dochází v holoformě proteinu. Mezi nejvýraznější změny s ohledem na statistiku dochází u aminokyselin H36, F43, H64, H97 a aminokyselin na C-konci proteinu, u kterých dochází k poklesu modifikace v holoformě myoglobinu. Všechny statisticky významné modifikace byly vyznačeny v struktuře myoglobinu znázorněné na obrázku 37 str. 65.



Obrázek 37: Strukturní zobrazení statisticky významných modifikovaných aromatických aminokyselin myoglobinu pomocí kyselého činidla (PDB kód 1WLA⁷⁷). Červeně znázorněná residua značí úbytek modifikace v holoformě a modře vyznačené znázorňují nárůst modifikace v holoformě. Neobarvená aromatická residua jsou statisticky nevýznamná. Zeleně je znázorněn hem.

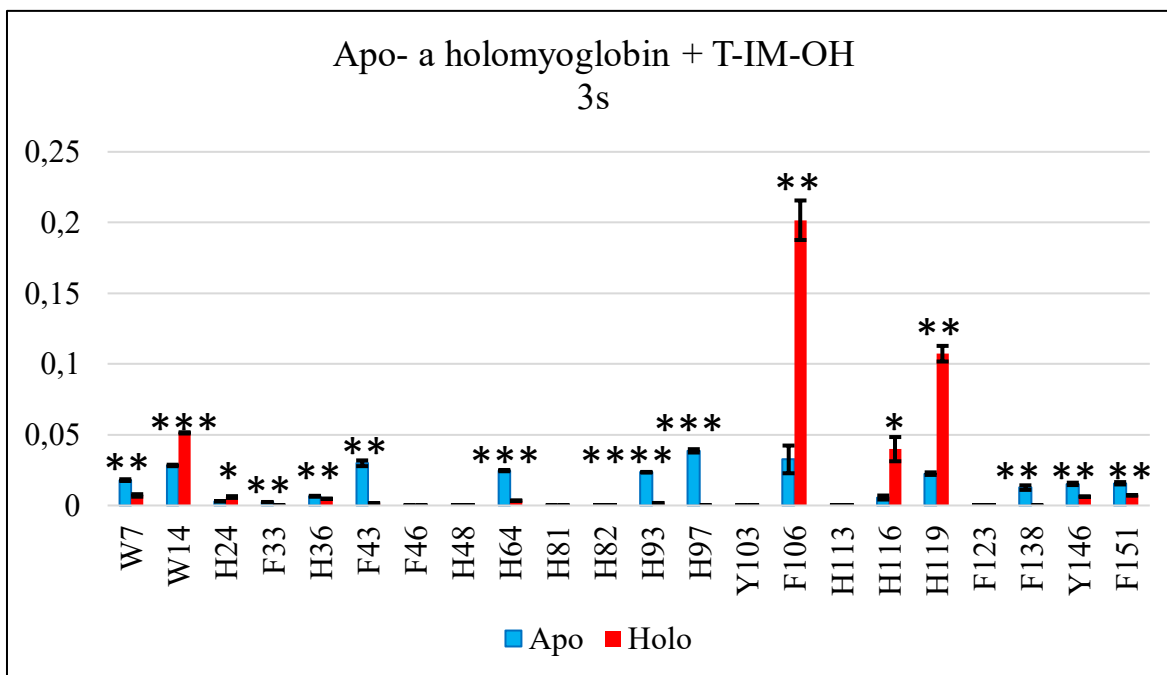
5.6.3 Kvantifikace aromatických aminokyselin apo- a holomyoglobinu pro imidazolové alkoholové činidlo

Výsledek kvantifikace aminokyselin pro reakci apo- a holomyoglobinu imidazolovým alkoholovým činidlem je znázorněn na grafu 6 str. 66 pro třicet sekundovou reakci a na grafu 7 str. 67 pro tři sekundovou reakci.



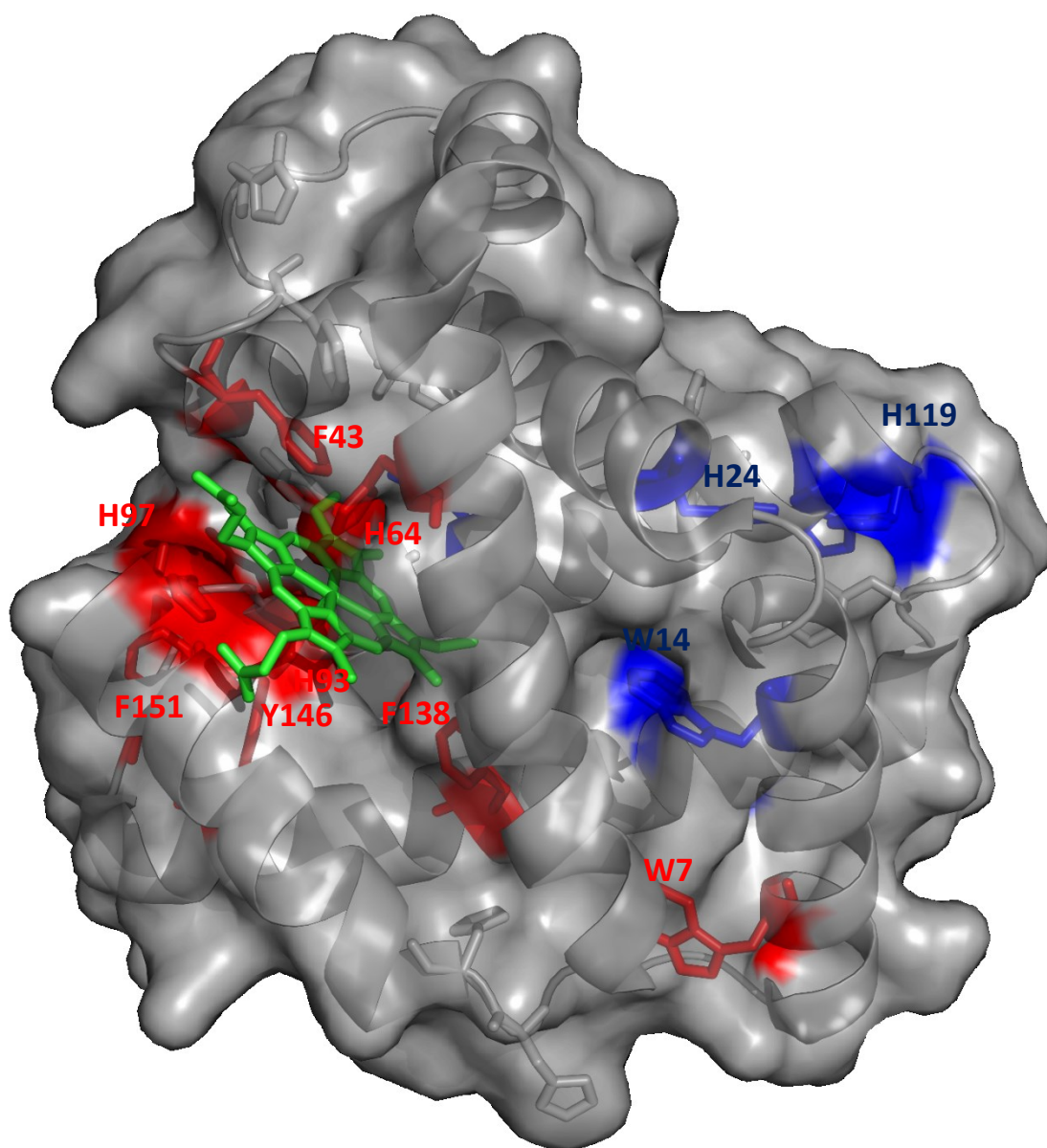
Graf 6: Kvantifikace aromatických aminokyselin myoglobinu pro reakci s imidazolovým alkoholovým činidlem pro 30 sekundovou reakci. Modré sloupce znázorňují modifikované množství v apo- formě myoglobinu a červené v holoformě myoglobinu. V tomto případě dochází pouze k úbytku modifikace v případě holoformy myoglobinu. Nejvýraznější úbytky modifikací jsou v případě aminokyselin F33, F43, H64, H97, F106, H113, H116 a aminokyseliny na C-konci proteinu.

V případě reakce apo- a holoformy myoglobinu s alkoholovým imidazolovým Togniho činidlem dochází téměř u všech aromatických aminokyselin k úbytku modifikací po přidání hemu k apoformě proteinu. Pouze u aminokyselin W14, H24, H82, H93 a H119 nedochází skoro k žádným změnám a aminokyseliny F46, H48, Y103 a F123 nejsou modifikovány.



Graf 7: Kvantifikace aromatických aminokyselin myoglobinu pro reakci s imidazolovým alkoholovým činidlem pro 3 sekundovou reakci. Modré sloupce znázorňují modifikované množství v apoformě myoglobinu a červené v holoformě myoglobinu. Hvězdičky znázorňují správnost výsledků, a jestli se daná změna mezi apo- a holoformou dá posuzovat jako pravdivá a důležitá. Podmínky pro počet hvězd jsou udávány statistickou P-hodnotou (**** - $P < 0,001$; *** - $P < 0,005$; ** - $P < 0,01$; * - $P < 0,05$). Grafy (hodnoty), které nejsou označeny hvězdičkou jsou považovány za statisticky nevýznamné a nelze s nimi dále pracovat. V tomto případě jsou největší změny v poměru kvantifikací u aminokyselin W7, F43, H64, H93, H97, F138, Y146, F151 kde dochází k úbytku modifikace v holoformě myoglobinu a u aminokyselin W14, F106, H116, H119 dochází k nárůstu modifikace v holoformě myoglobinu.

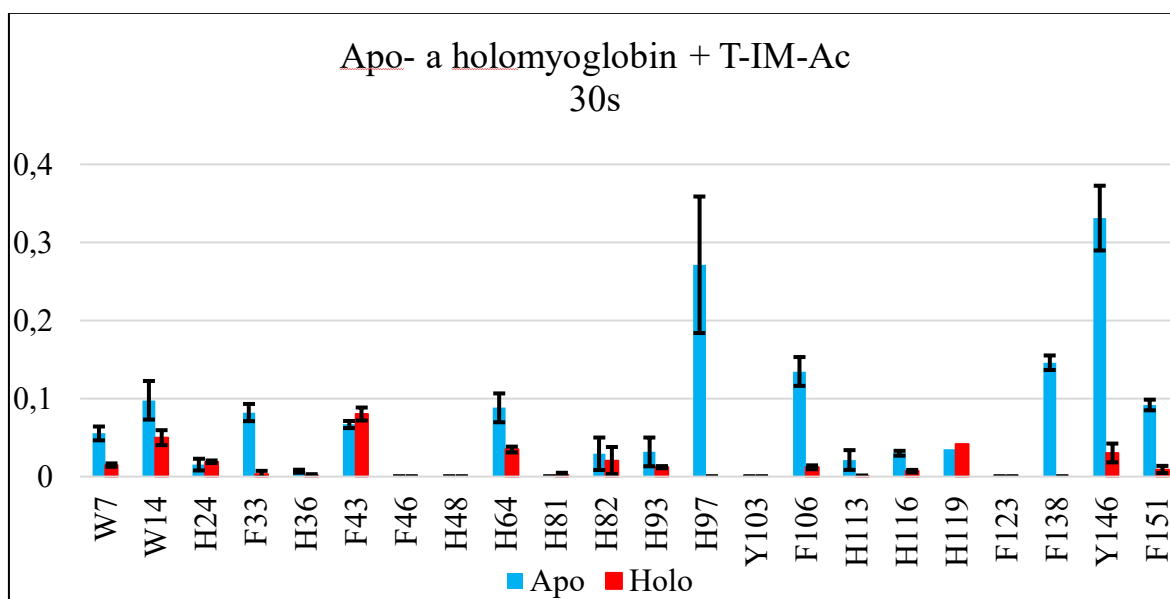
Při tří sekundové reakci alkoholového imidazolového činidla lze pozorovat nejvyšší nárůst modifikace na aminokyselinách F106, H119 a to primárně v přítomnosti hemu v holoformě myoglobinu. Ostatní aminokyseliny se modifikují v řádech jednotek procent. Nejvýraznější změny v modifikacích mezi apo- a holoformou jsou u aminokyselin W14, F106, H116 a H119, kde dochází k nárůstu modifikace v případě holoformy zatímco k výrazným poklesům modifikace v případě holoformy dochází u aminokyselin F43, H64, H93, H97 a C-konci proteinu. U aminokyselin F46, H48, Y103, H113 a F123 nedochází k modifikaci ani u jedné z forem proteinu myoglobin. Všechny statisticky významné modifikace byly vyznačeny v struktuře myoglobinu znázorněné na obrázku 38 str. 68.



Obrázek 38: Strukturní zobrazení statisticky významných modifikovaných aromatických aminokyselin myoglobinu pomocí imidazolového alkoholového činidla (PDB kód 1WLA⁷⁷). Červeně znázorněná residua značí úbytek modifikace v holoformě a modře vyznačené znázorňují nárůst modifikace v holoformě. Neobarvená aromatická residua jsou statisticky nevýznamná. Zeleně je znázorněn hem.

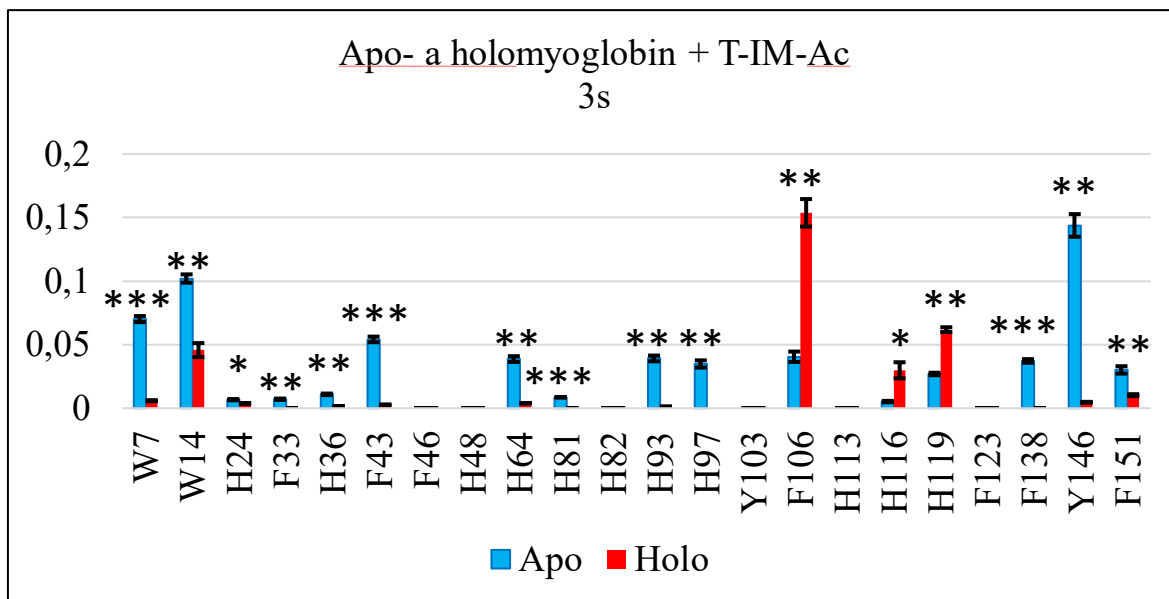
5.6.4 Kvantifikace aromatických aminokyselin apo- a holomyoglobinu pro imidazolové alkoholové činidlo

Výsledek kvantifikace aminokyselin pro reakci apo- a holomyoglobinu imidazolovým kyselým činidlem je znázorněn na grafu 8 str. 69 pro třiceti sekundovou reakci a na grafu 9 str. 70 pro tří sekundovou reakci.



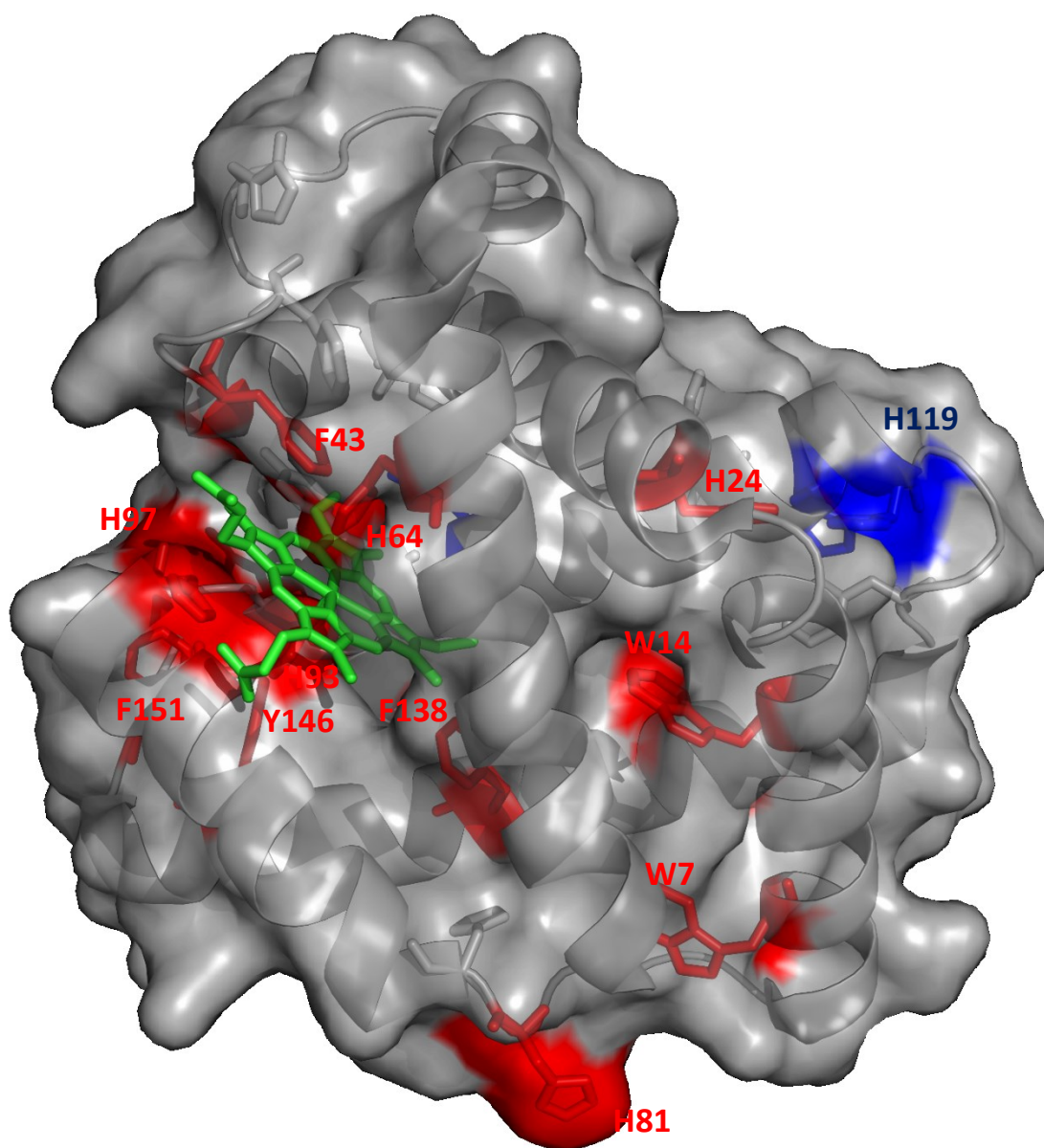
Graf 8: Kvantifikace aromatických aminokyselin myoglobinu pro reakci s imidazolovým kyselým činidlem pro 30 sekundovou reakci. Modré sloupce znázorňují modifikované množství v apoformě myoglobinu a červené v holoformě myoglobinu. K nejvýraznějším změnám dochází na aminokyselinách W7, W14, F33, H64, H97, F106, H113, H116, F138, Y146 a F151. U všech vyjmenovaných aminokyselin dochází k úbytku modifikace v holo formě proteinu.

V případě kyselého imidazolového Togniho činidla lze sledovat, že po 30s reakci jsou modifikována téměř všechna aromatická residua kromě F46, H48, Y103 a F123. Zbytek aminokyselin je modifikovaných a u většiny případů dochází k úbytku modifikace v holoformě myoglobinu, kromě aminokyselin F43 a H119, kde lehce převažuje nárůst modifikace v holoformě myoglobinu.



Graf 9: Kvantifikace aromatických aminokyselin myoglobinu pro reakci s imidazolovým kyselým činidlem pro 3 sekundovou reakci. Modré sloupce znázorňují modifikované množství v apoformě myoglobinu a červené v holoformě myoglobinu. Hvězdičky znázorňují správnost výsledků a jestli se daná změna mezi apo- a holoformou dá posuzovat jako pravdivá a důležitá. Podmínky pro počet hvězd jsou udávány statistickou P-hodnotou (*** - $P < 0,005$; ** - $P < 0,01$; * - $P < 0,05$). Grafy (hodnoty), které nejsou označeny hvězdičkou jsou považovány za statisticky nevýznamné a nelze s nimi dále pracovat. V tomto případě jsou největší změny v poměru kvantifikací u aminokyselin W7, W14, F33, F43, H64, H81, H93, H97, F138, Y146, F151 kde dochází k úbytku modifikace v holoformě myoglobinu a u aminokyselin F106, H116, H119 dochází k nárůstu modifikace v holoformě myoglobinu.

Při tří sekundové reakci imidazolového kyselého činidla nedochází k modifikaci aromatických aminokyselin F46, H48, H82, Y103 a H113. Nejvíce modifikované aminokyseliny jsou F106, který je modifikovaný více v holoformě a Y146, který je modifikován více v apoformě proteinu myoglobinu. Ostatní aminokyseliny jsou modifikovány do cca 10%. Nejvýraznější změny jsou u aminokyselin W7, W14, F43, H64, H93, H97 a aromatických aminokyselin na C-konci proteinu, u kterých dochází k úbytku modifikace v holoformě myoglobinu. Výrazné změny, kdy dochází k nárůstu modifikací v holoformě proteinu jsou u aminokyselin F106, H116 a H119. Všechny statisticky významné modifikace byly vyznačeny v struktuře myoglobinu znázorněné na obrázku 39 str. 71.



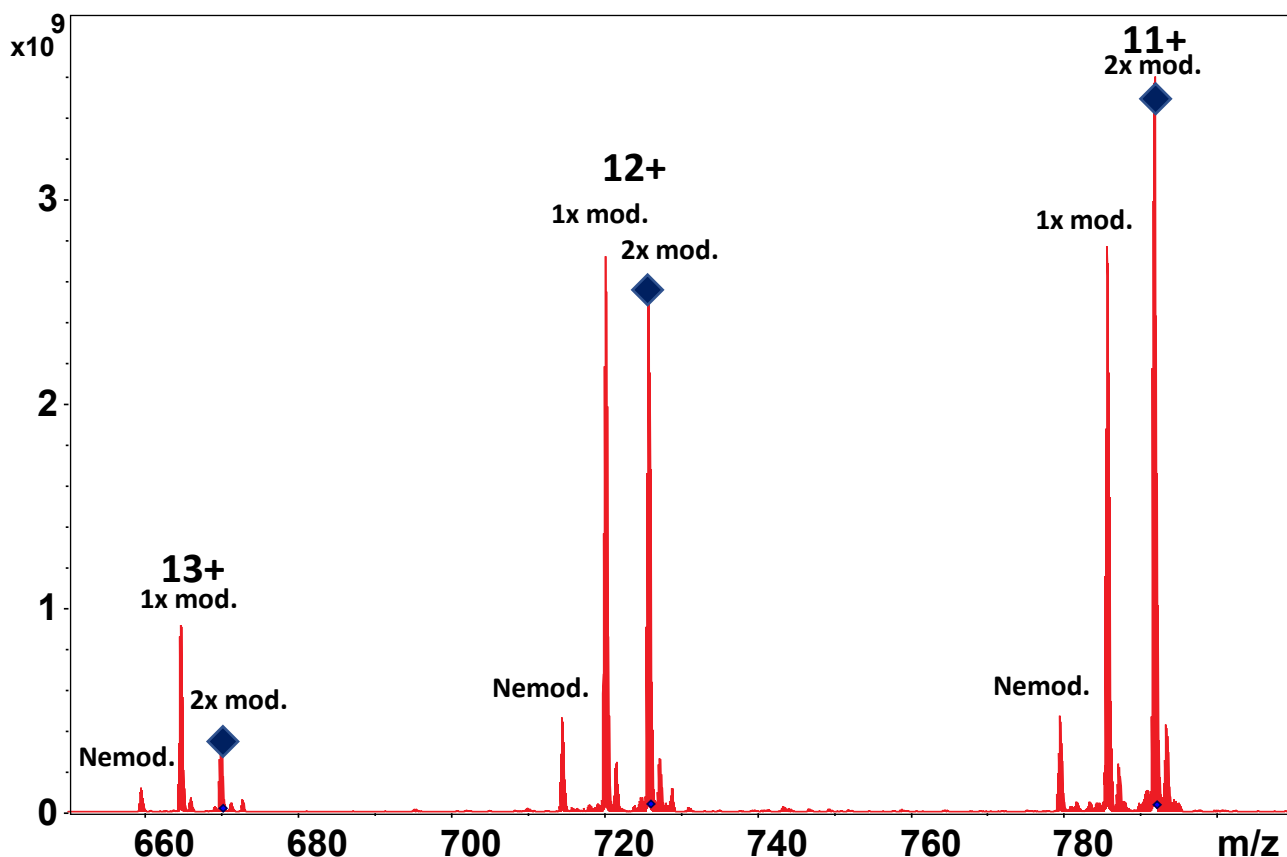
Obrázek 39: Strukturní zobrazení statisticky významných modifikovaných aromatických aminokyselin myoglobinu pomocí imidazolového kyselého činidla (PDB kód 1WLA⁷⁷). Červeně znázorněná residua značí úbytek modifikace v holoformě a modře vyznačené znázorňují úbytek modifikace v apoformě. Neobarvené aromatická residua jsou statisticky nevýznamná. Zeleně je znázorněn hem.

6 Diskuze

V předkládané diplomové práci jsme se zabývali radikálovým značením proteinů pomocí Togniho činidel s následnou analýzou pomocí hmotnostní spektrometrie. V prvním kroku jsme se rozhodli určit, které aminokyseliny lze modifikovat pomocí použitého značení, k čemuž jsme použili směs proteinogenních aminokyselin a cystin. Při radikálovém značení aminokyselin Togniho činidly znázorněného na obrázku 28 str. 51 (viz kapitola 5.2) vyplývá, že z 20 možných aminokyselin dochází k modifikaci na pouze pěti z nich a to: Trp, Tyr, Phe, His a Cys. V případě tryptofanu dochází ke dvěma modifikacím na jeho skeletu. Důvodem bude nejspíše to, že indol (který tryptofan obsahuje ve svém postranním řetězci) obsahuje dva aromatické kruhy a oba mohou být modifikovány. Zda dochází k preferenci nějakého z kruhů, není z našich dat známo, ale v případě proteinů to bude dáno sterickými vlastnostmi a dostupností radikálu k danému z kruhů. Z hlediska reaktivity je tryptofan mnohem více reaktivní než ostatní aminokyseliny, což může mít za následek jeho dvojnásobnou modifikaci. Dalším z důvodů nižší reaktivity tyrosinu a histidinu může být fakt, že jsou poměrně elektronově bohatší než ostatní značené aminokyseliny a deprotonací těchto aminokyselin může docházet k nižším výtěžkům. Z hlediska reaktivity po LC-MS analýze vyplývá, že druhou nejvíce reaktivní aminokyselinou vůči radikálům pořízených z Togniho činidel je cystein, následně tyrosin, histidin a fenylalanin. V případě fenylalaninu dochází k tvorbě dvou isomerů v závislosti, na jaké pozici je navázán daný radikál. Vysoká reaktivita cysteinu může být přiřazena mechanismu reakce, kde dochází k homolytickému štěpení disulfidických můstků následovaném radikálovou rekombinací⁷⁸.

Jako první modelový protein byl pro následující experimenty zvolen ubiquitin z hovězích erytrocytů, protože jeho molekulová hmotnost je malá, což je výhodné pro analyzování pomocí FT-ICR MS a v naší laboratoři s ním máme dlouholeté zkušenosti. Po radikálové reakci, která trvala třicet sekund, byl protein analyzován pomocí FT-ICR MS a získaná spektra jsou znázorněna na obrázku 29 str. 52 (viz kapitola 5.3). Z výsledných spekter je patrné, že dochází k tvorbě radikálově značeného ubiquitinu v případě všech čtyř využitých činidel. Nicméně v případě trifluormethylových radikálů (kyselé a alkoholové činidlo) dochází až k třem modifikacím, kde nejvíce intenzivní populací je 1x modifikovaný protein a populace znázorňující oxidaci je velmi málo intenzivní. U imidazol-tetrafluorethylových radikálů dochází pouze ke dvěma modifikacím proteinu, kde nejvíce intenzivní populace je nemodifikovaný protein a populace pro 2x modifikovaný protein je

mnohem méně intenzivní než dvě ostatní. Vysvětlení, proč dochází k rozdílnému množství modifikací při použití stejných typů činidel, ale s rozdílnými typy radikálů může být buď v reaktivitě jednotlivých radikálů anebo dané přístupností a reaktivitou povrchu proteinu, což bylo popsáno P. Novákem a G. H. Kruppou⁷⁹. Imidazol-tetrafluorethylový radikál je z pohledu přístupnosti mnohem větší, než trifluormethylový a k některým částem proteinu má mnohem obtížnější přístupnost. Pokud bychom srovnávali rozdíl mezi dvěma stejnými radikály, ale vzniklých z odlišných typů činidel (alkoholové versus kyselé) tak v případě trifluormethylových radikálů jsou o trochu více intenzivní radikály vzniklé z kyselého činidla, ale tyto změny nejsou výrazné a není relevantní na základě dat pouze ze značení ubiquitinu dělat závěry co se týče reaktivity těchto činidel. Pro fragmentační analýzu pomocí „Top down“ hmotnostní spektrometrie byly zvoleny dvě techniky. ETD, tedy fragmentace přenosem elektronu a druhá byla kombinace CID-ECD, tedy kombinace kolizní indukované disociace s fragmentací pomocí přenosu elektronu. Obě tyto techniky byly vybrány z důvodu, že se jedná o fragmentace přenosem elektronu, které by neměly způsobovat ztrátu radikálových značek, což se ukázalo při použití CID či IRMPD fragmentace (data nejsou doposud publikována). V druhém případě se nejedná o pouze o fragmentaci pomocí elektronu, protože CID je energetická kolizní technika, ale důvod využití CID spočíval v tom, že velmi malá kolizní energie měla způsobit vznik stabilních fragmentů a nedocházelo jen ke ztrátě náboje fragmentované molekuly⁷¹. V případě ETD byly ve výsledných fragmentačních spektrech detekovány ionty s přítomností modifikace v poměrně velké míře (ionty, které nesly pro nás důležitou informaci, jsou znázorněny v tabulce 7 str. 55) na to, abychom byli schopni s poměrně velkou přesností lokalizovat modifikované aminokyseliny na molekule ubiquitinu. Pomocí ETD byly identifikovány aminokyseliny F4, Y59, H68. V případě kombinace CID-ECD bylo detekováno velmi málo iontů, který byly označeny ať už trifluormethylovými nebo imidazol-tetrafluorethylovými radikály. Po důkladné analýze fragmentačního spektra po kolizně indukované disociaci, bylo zjištěno, že dochází ke ztrátě modifikace z molekuly proteinu. Jelikož je vazba mezi aromatickým kruhem postranních řetězců aminokyselin a fluorovaných radikálů velmi elektronově bohatá, dochází k její fragmentaci již při nízkých energiích (použitá energie 3 eV, standardně využívaná energie je kolem 10 eV) a tím i ztrátě modifikace z proteinu již před začátkem fragmentace páteře proteinu. Spektrum, kde je vidět ztráta modifikace je znázorněno na obrázku 40 str. 74.



Obrázek 40: Fragmentační spektrum ubiquitinu po kolizně indukované analýze o energii 3 eV. Na obrázku jsou znázorněny 3 nábojové stavy (13-11+), které obsahují 3 populace isotopových obálek. Isotopové obálky označené modrým čtvercem, znázorňují izolované isotopové obálky určené k fragmentaci. Již při velmi malé energii (3 eV) dochází ke ztrátě modifikaci, vedle 2x modifikované populace, která byla izolována, vzniká 1x a nemodifikovaná modifikace díky ztrátě radikálové značky.

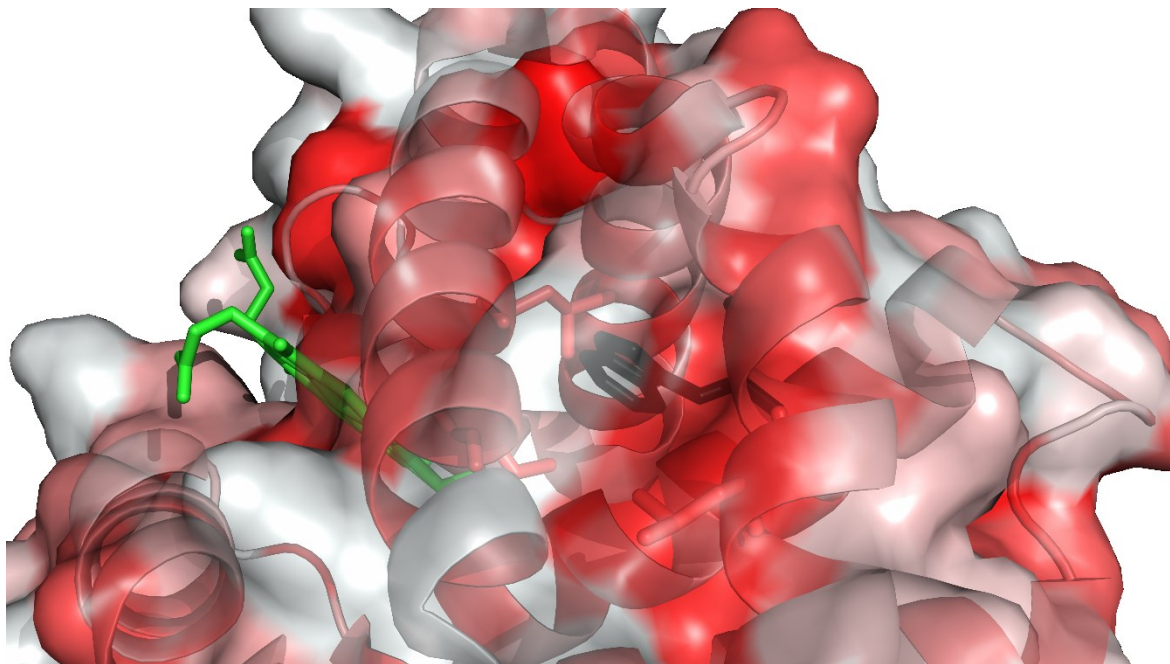
Z výsledku CID-ECD fragmentace byla jako modifikované aminokyselina označen pouze tyrosin v pozici 59, o ostatních aromatických aminokyselinách neposkytl tato fragmentace jednoznačnou informaci.

Jako druhý protein pro radikálové značení Togniho činidla byl vybrán myoglobin, lépe řečeno tento protein byl zvolen jako první systém, na kterém byly sledovány změny v důsledku konformačních změn v jeho struktuře s hemem a bez hemu. Před zkoumáním strukturních změn bylo nutné optimalizovat podmínky jeho značení, které jsou znázorněny na obrázku 33 str. 57 (viz kapitola 5.5). Na začátku experimentu byly podmínky zvoleny totožné jako pro značení ubiquitinu, ale v případě myoglobinu docházelo po třiceti sekundové reakci k přemodifikování proteinu. Při nižších časových úsecích už nedocházelo k přemodifikování proteinu, ale stále byly přítomny oxidace proteinu, které vznikly špatnou přípravou značícího pufru diskutované v první části diskuze. Z důvodů přítomnosti malého množství kyslíku v pufru, mohlo dojít při radikálové reakci ke vzniku meziproduktů ve

formě radikálů kyslíku, které se pak mohou vázat na protein a experiment tak komplikují. V případě třiceti sekund, kdy reakce probíhá relativně dlouho, může docházet ke vzniku i jiných radikálů, například karbenových radikálů z bikarbonátového pufru⁵⁰, což ztěžuje výslednou interpretaci dat z MS spekter. Jako optimální čas, byly zvoleny tři sekundy, protože při takto dlouhé reakci jsou nejintenzivnější populací ve spektru právě 1x modifikované proteiny. Z předchozího radikálového značení ubiquitinu bylo patrné, že v případě imidazol-tetrafluorethylových radikálů dochází k nižším výtěžkům značením, než tomu je u trifluormethylových radikálů. K následným experimentům, ve kterých jsme chtěli kvantifikovat konformační změny proteinu v přítomnosti a nepřítomnosti hemu, byly zvoleny dva časové úseky třicet a tři sekundy. Třicet sekund bylo zvoleno z obav, abychom neztráceli při krátkých časových intervalech důležité informace o struktuře. Při porovnání výsledných extrahovaných iontových chromatogramů pro peptid 1-16, které jsou znázorněné na obrázku 35 str. 59 (viz kapitola 5.6), je patrné, že v případě třicetisekundové reakce vzniká velké množství produktů a naším cílem bylo získat ideálně jedenkrát modifikovaný peptid, který daleko více odpovídá nativní konformaci proteinu. Při pohledu na MS spektra pořízené po analýze třísekundových reakcí znázorněné na obrázku 34 str. 58 (viz kapitola 5.5), je patrné, že výsledné MS spektrum není tolik komplexní, a kromě produktů radikálového značení Togniho činidly se nevyskytují skoro žádné jiné produkty vedlejších reakcí (například oxidace proteinu). Při pohledu na grafy 2 str. 60, 4 str. 63, 6 str. 66 a 8 str. 69, které znázorňují kvantifikaci aromatických aminokyselin při třiceti sekundové reakci, je u všech čtyř činidel patrné, že dochází k přílišnému navázání radikálů na molekulu proteinu. Dále je patrné, že chybovost mezi jednotlivými opakováními (provedeno v triplicátu) je poměrně vysoká a směrodatné odchylky jsou tak v některých případech velmi vysoké. Z těchto důvodů jsme se rozhodli neprovádět žádné další statistické výpočty, protože by většina výsledků kvantifikace byla statisticky nevýznamná a ze stejného důvodu jsme tyto výsledky ani neznázorňovali do krystalové struktury myoglobinu. Již výše byl diskutován problém s interpretací dat třiceti sekundové reakce, kdy může docházet i k jiným dějům, které komplikují vyhodnocení dat a tím i zvyšují nepřesnost kvantifikace výsledků. Dalším důvodem, proč je kvantifikace dat poměrně nepřesná, je ten, že při přemodifikování proteinu může docházet ke zničení jeho nativní struktury a tím pak zkoumání jiné umělé struktury. Možný průběh třiceti sekundové reakce lze představit tak, že v prvních sekundách dochází k radikálovému značení nativní struktury a následně vlivem velkého množství radikálů dochází k postupnému kolapsu struktury a již nedochází k reflektování nativní struktury, ale struktury zkolabované. V případě tří sekundových reakcí nebyla jednotlivá

opakování významně statisticky odlehlá, a proto u nich byla provedena statistická analýza základních parametrů u všech čtyř Togniho činidel a její výsledky byly znázorněny do struktury myoglobinu. V případě alkoholového činidla a kyselého činidla, které obě poskytují trifluormethylové radikály jsou výsledky velmi podobné. Mimo rozdílů v intenzitách, nebo lépe řečeno v množství modifikací jednotlivých aminokyselin, byly identifikovány dvě aminokyseliny, které se liší opačným poměrem modifikace. Jednou z nich je aminokyselina histidin na pozici 93, tato aminokyselina je zodpovědná za koordinaci hemu do struktury myoglobinu. V případě alkoholového činidla lze pozorovat pokles modifikace v přítomnosti hemu ve struktuře, což je očekávaný jev, protože v přítomnosti hemu by se aminokyseliny v jeho vazném místě (aktivním místě proteinu) neměly modifikovat, jako je tomu u všech ostatních aminokyselin, které se v tomto místě také nacházejí. Vysvětlení proč se u kyselého činidla tento trend neprokázal, může být v reaktivitě činidla. V jejím důsledku vzniká více radikálů, které se mohou pomocí různých kavit nebo volných míst ve struktuře dostat k dané aminokyselině, anebo naopak v apoformě proteinu se radikál k této aminokyselině z nějakých důvodů nedostal. Když porovnáme vliv těchto dvou činidel na modifikaci H93, tak v případě alkoholového činidla je v apoformě proteinu téměř 15 % H93 modifikováno, ale v případě kyselého činidla to není ani 10 %. V případě holoformy jsou množství modifikace přibližně stejné. Z těchto důvodů můžeme soudit, že problém pravděpodobněji nastal při značení apoformy. Například, že díky o něco vyšší reaktivitě kyselého činidla budou tyto radikály raději atakovat jiné aromatické aminokyseliny v blízkosti H93 než právě samotný histidin. Tento problém by se teoreticky mohl vyřešit snížením času reakce, kdy by teoreticky mohlo dojít k menšímu množství modifikace v holoformě a dosáhli bychom stejného trendu jako v případě alkoholového činidla, jen méně intenzivního. Nicméně podle statistiky je tento výsledek nevýznamný. Další aminokyselinou, kde dochází ke změně mezi dvěma typy činidel je tryptofan na pozici 14. Zde u alkoholového činidla dochází k nárůstu modifikace v holoformě proteinu a v případě kyselého činidla dochází k nárůstu modifikace v apoformě proteinu. Jelikož se tento jev opakuje i při porovnání kyselého alkoholového činidla, které produkuje imidazol-tetrafluorethylové radikály, tak jsme odpověď hledali u rozdílných druhů chemické struktury výchozích činidel. Dva druhy činidel se liší v typu skupiny na kruhu obsahující jod. Alkoholové činidlo obsahuje dva methyly a kyselé oxo skupinu. Tento rozdíl se projeví v polaritě činidla. Proto jsme se zaměřili na polaritu proteinu v oblasti kde se W14 nachází. Tato oblast je znázorněna na obrázku 41 str. 77. Z obrázku je patrné, že tato oblast je velmi nepolární a pravděpodobně dochází k částečnému navázání jednoho z činidel již před

radikálovou reakcí a tím se projeví nadbytek modifikace v dané oblasti, jelikož radikály atakují nejbližší možnou aromatickou aminokyselinu.

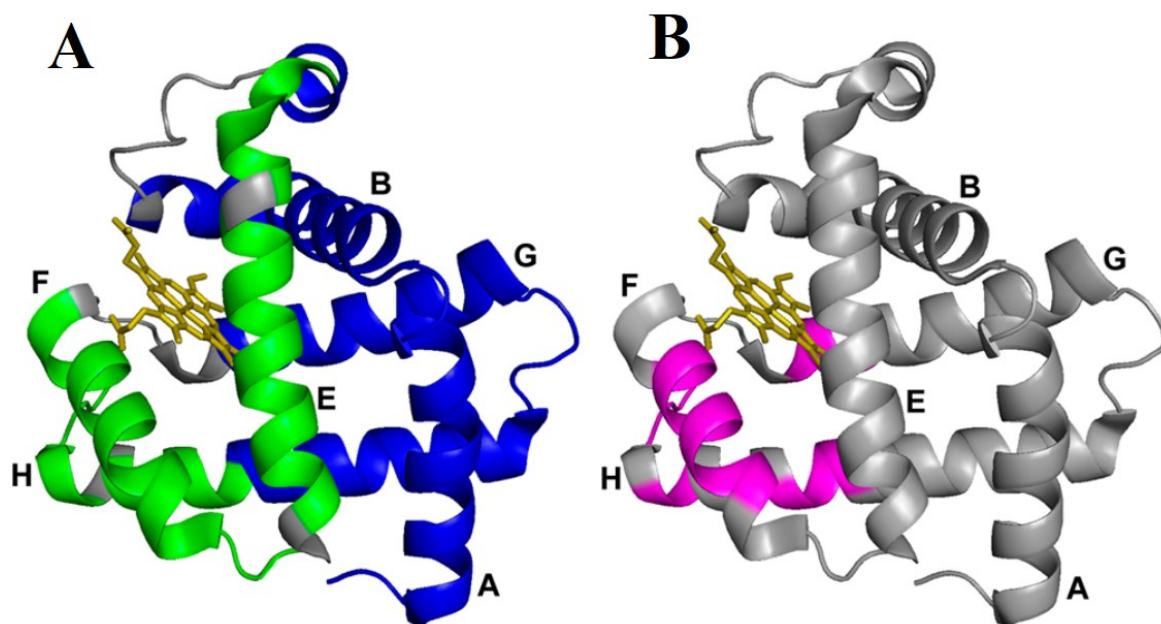


Obrázek 41: Znázornění polaritu v oblasti aminokyselin W14 ve struktuře myoglobinu (1WLA⁷⁷). Černě znázorněný je tryptofan na pozici 14. Červené barva znázorňuje nepolární oblast a bílá polární oblast.

V případě imidazolového alkoholového činidla a imidazolového kyselého činidla dochází k jedinému znatelnému rozdílu na tryptofanu 14, který byl diskutován výše. V případě H24 se podle statistických dat jedná o významné výsledky, nicméně množství na této modifikaci je velmi nízké a diskutovat, zdali dochází k nějaké změně mezi těmito činidly je poměrně obtížné. Co se týče reaktivity těchto dvou činidel, opět je o trochu více reaktivní imidazolové kyselý činidlo, což dokazuje i více modifikovaných aminokyselin, například H81. Při porovnání výsledků vzniklých dvou typů radikálů je také rozdíl v reaktivitě, kdy trifluormethylové radikály jsou více reaktivní než imidazol-tetrafluorethylové radikály.

Nicméně je zde jeden rozdíl, a to u aminokyselin F106 a H116, které jsou výrazně více modifikovány v případě imidazol-tetrafluorethylových radikálů. Tento nárůst je ještě více znatelný v holoformě myoglobinu. Jedno z možných vysvětlení je, že imidazol-tetrafluorethylové radikály jsou mnohem větší než trifluormethylové radikály a nedostanou se tak k některým residuím, které jsou více stericky bráněné. Z toho důvodu modifikují aminokyseliny, které jsou pro ně stericky přístupné. Všechny tři tyto aromatické aminokyseliny se vyskytují na stejném α -helixu, a nepodílí se na koordinaci hemu ve struktuře myoglobinu.

Výsledky radikálového značení myoglobinu pomocí Togniho činidel jsme vizualizovali do struktury myoglobinu, jež byla vyřešena rentgeno-strukturní analýzou (Obrázky 36 str. 62, 37 str. 65, 38 str. 68 a 39 str. 71). Ze zmíněných obrázků vyplývá, že naše vykazují se strukturou vysokou shodu. Největší úbytek modifikace v případě holoformy myoglobinu byl prokázán ve vazebném místě hemu k proteinu. Což je způsobeno faktem, že v nepřítomnosti hemu, je vazebné místo lépe přístupné rozpouštědlu, tedy i radikálům, které jsou schopné reagovat s aromatickými aminokyselinami. Jako další metody pro srovnání výsledků, jsme zvolili příbuzné, již zavedené metody strukturní proteomiky, jako je H-D výměna a FPOP. Výsledky těchto dvou metod, jsou znázorněny na obrázku 42 str. 79, tyto dva experimenty byly provedeny laboratoří Larse Konermanna⁴⁶, jejíž výsledky jsou taktéž znázorněny na struktuře myoglobinu se stejným PDB kódem 1WLA⁷⁷. V případě experimentu FPOP, byly naše výsledky téměř totožné. Jak je vidět na obrázku 42 str. 79, dochází k výrazné protekci proteinu hemem (zelené části proteinu). V případě helixu A, na kterém se vyskytují tryptofany v pozici 7 a 14, které jsou modifikovány Togniho činidlem, v případě experimentu FPOP nejsou vidět žádné změny na rozdíl od našich výsledků. Pravděpodobně je to dáno odlišným znázorněním výsledků experimentu do struktury. V této práci byly znázorněny jednotlivé aminokyseliny, ale v případě experimentu laboratoře Larse Konermanna jsou znázorněné celé oblasti peptidové páteře a z tohoto důvodu může dojít k mírným odchylkám. Například v případě, kdy je jedna aminokyselina protektována v holo formě a druhá v apoformě, výsledná změna se vyruší a na daném helixu se neprojeví. Dále je možné, že ke změnám dochází i v případě FPOPu, ale změny jsou velmi malé a nebyly považovány za důležité. Z těchto důvodů byl v našem případě pro vizualizaci dat zvolen statistický přístup zhodnocení výsledků, a zvýrazněné byly pouze statisticky významné změny. Jedinou výraznou odchylkou od našich výsledků je helix G, na kterém bylo v případě značení Togniho činidly pozorováno navýšení modifikace v holoformě myoglobinu. Tato změna může být dána specifikou používaných radikálů, protože v případě Togniho činidel, byla výrazná změna pozorována pouze po použití imidazol-tetrafluorethylových radikálů.



Obrázek 42: Struktury myoglobinu (1WLA⁷⁷) znázorňující regiony, které jsou nevíce ovlivněné přítomností/nepřítomností hemu různými metodami hmotnostní spektrometrie⁴⁶
 A) FPOP, zeleně je znázorněn region, který podléhá největší změně po odstranění hemu ze struktury pomocí hydroxylových radikálů. B) H-D výměna, růžová barva znázorňuje region s největšími změnami v deuteraci po odstranění hemu ze struktury. Šedé a modré regiony proteinů nepodléhají změnám v modifikacích mezi apo- a holoformou myoglobinu.

Na obrázku 42 B, jsou znázorněny výsledky po H-D výměně. Opět i zde lze sledovat protekci proteinu molekulou hemu, když je ve vazebném místě, je vidět největší změna v deuteraci proteinu mezi apo- a holoformou proteinu. V případě helixu G, je vidět také změna v deuteraci, která se shoduje s našimi výsledky po radikálovém značení Togniho činidla, na rozdíl od FPOP experimentu. Největší rozdíly mezi H-D výměnou a radikálovým značením, jak pomocí hydroxylových radikálů (FPOP) tak i radikálů vzniklých z Togniho činidel je v případě helixu E. Tato změna bude pravděpodobně způsobená tím, že v případě H-D výměny sledujeme přístup rozpouštědla k páteři proteinu, ale v případě metod radikálového značení sledujeme přístup rozpouštědla k postranním řetězcům aminokyselin a je pravděpodobné, že přístupnost rozpouštědla bude u páteře proteinu nižší než u postranních řetězců aminokyselin. Poslední metodou, jejíž výsledky zde budu diskutovat, je metoda laboratoře Michaela Grosse, zmíněná v kapitole 1. 2. 2. 5, tedy značení pomocí trifluormethylového radikálu generovaného laserem z Langloisova činidla. V tomto případě je možné porovnávat pouze data z aromatických aminokyselin. Červené sloupce na obrázku 18 str. 30, znázorňují holoformu myoglobinu a zelené apoformu myoglobinu. Největší změny jsou u sloupce znázorňující aminokyseliny H81, H82, H93, kde dochází k výraznému poklesu v holoformě proteinu a další výrazný nárůst je u aminokyseliny H119, kde dochází

k nárůstu modifikovaného proteinu v apoformě. Tyto výsledky se naprosto shodují s našimi a je možné říct, že nezáleží na tom, jak jsou radikály tvořené, ale pouze na jejich typu. V našem případě, se podařilo označit více residuí, což může být přisouzeno delší časové škále.

Během měření jsme mimo jiné došli k závěru, že interpretaci naměřených spekter mohou komplikovat nežádoucí oxidace proteinu a v krajních případech může dojít i k znehodnocení experimentu z důvodu, že místo nativního proteinu, z jehož struktury vycházíme, je možné že se modifikuje už jednou modifikovaný protein z důvodů oxidace. Jako příklad, kdy byl použit starý značící pufr je obrázek 33 str. 57 (viz kapitola 5.5), kde přítomnost oxidace proteinu komplikuje interpretaci spektra (viz diskuze níže). A proto je jedna z nejvíce důležitých součástí radikálového značení příprava značícího pufru. Příprava se skládá z 3 částí, které jsou popsány na obrázku 27 str. 49 (viz kapitola 5.1). Jak ukazují naše výsledky, je nutné vždy použít nově připravený značící pufr, který je nutné sytit heliem. Délka sycení je závislá na množství pufru (50 ml cca 2 minuty). Po nasycení je znatelný pokles oxidace proteinu. Pro ještě výraznější pokles oxidace je lepší pufr následně odplynit a zopakovat znovu proceduru sycení. Po této proceduře je příspěvek oxidace už zanedbatelný.

Závěrem lze říci, že data získané z radikálového značení pomocí Togniho činidel na modelovém proteinu, korelují jak se strukturními modely obou forem proteinu tak i s dalšími metodami strukturní proteomiky.

7 Závěr

- Byly optimalizovány podmínky radikálové reakce
- Byly identifikovány aminokyseliny citlivé k modifikacím pomocí fluoralkylových radikálů
- Bylo provedeno značení modelových proteinů fluoralkylovými radikály a byly nalezeny podmínky pro identifikaci a kvantifikaci modifikovaných aminokyselin hmotnostní spektrometrií
- Byla potvrzena vhodnost použití fluoralkylových radikálů pro sledování strukturních změn proteinů (studie konformačních změn mezi apo- a holoformou myoglobinu)

8 Citace

1. Boehr DD, Nussinov R, Wright PE. The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition. *Nat Chem Biol.* 2009;5(11):789-796. doi:10.1038/nchembio.232
2. Parker MW. Protein Structure from X-Ray Diffraction. In: *Journal of Biological Physics.* Vol 29. ; 2003:341-362. doi:10.1023/A:1027310719146
3. Milne JLS, Borgnia MJ, Bartesaghi A, et al. Cryo-electron microscopy - A primer for the non-microscopist. *FEBS J.* 2013;280(1):28-45. doi:10.1111/febs.12078
4. Mittermaier A, Kay LE. New tools provide new insights in NMR studies of protein dynamics. *Science (80-).* 2006;312(5771):224-228. doi:10.1126/science.1124964
5. Konermann L, Vahidi S, Sowole MA. Mass Spectrometry Methods for Studying Structure and Dynamics of Biological Macromolecules. *Anal Chem.* 2014;86(1):213-232. doi:10.1021/ac4039306
6. Nilsson T, Mann M, Aebersold R, Yates JR, Bairoch A, Bergeron JJM. Mass spectrometry in high-throughput proteomics: Ready for the big time. *Nat Methods.* 2010;7(9):681-685. doi:10.1038/nmeth0910-681
7. Konermann L, Pan J, Liu YH. Hydrogen exchange mass spectrometry for studying protein structure and dynamics. *Chem Soc Rev.* 2011;40(3):1224-1234. doi:10.1039/c0cs00113a
8. Pauling L, Corey RB. Configurations of Polypeptide Chains With Favored Orientations Around Single Bonds: Two New Pleated Sheets. *Proc Natl Acad Sci.* 1951;37(11):729-740. doi:10.1073/pnas.37.11.729
9. Hvidt A, Linderstrøm-Lang K. Exchange of hydrogen atoms in insulin with deuterium atoms in aqueous solutions. *BBA - Biochim Biophys Acta.* 1954;14(C):574-575. doi:10.1016/0006-3002(54)90241-3
10. Konermann L, Vahidi S, Sowole MA. Mass spectrometry methods for studying structure and dynamics of biological macromolecules. *Anal Chem.* 2014;86(1):213-232. doi:10.1021/ac4039306
11. Hvidt A, Nielsen SO. Hydrogen exchange in proteins. *Adv Protein Chem.* 1966;21:287-386. doi:10.1016/s0065-3233(08)60129-1
12. Bai Y, Milne JS, Mayne L, Englander SW. Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Proteins Struct Funct Bioinforma.* 1993;17(1):75-86. doi:10.1002/prot.340170110
13. Hvidt A, Linderstrøm-Lang K. The kinetics of the deuterium exchange of insulin with D₂O. An amendment. *BBA - Biochim Biophys Acta.* 1955;16(C):168-169. doi:10.1016/0006-3002(55)90200-6
14. Singh H, Busenlehner LS. Probing backbone dynamics with hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Methods Mol Biol.* 2014;1084:81-99. doi:10.1007/978-1-62703-658-0_5
15. Glasoe PK, Long FA. Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium

- oxide. *J Phys Chem*. 1960;64(1):188-190. doi:10.1021/j100830a521
16. Brown KA, Wilson DJ. Bottom-up hydrogen deuterium exchange mass spectrometry: Data analysis and interpretation. *Analyst*. 2017;142(16):2874-2886. doi:10.1039/c7an00662d
17. Brier S, Maria G, Carginale V, et al. Purification and characterization of pepsins A1 and A2 from the Antarctic rock cod *Trematomus bernacchii*. *FEBS J*. 2007;274(23):6152-6166. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.06136.x
18. Cravello L, Lascoux D, Forest E. Use of different proteases working in acidic conditions to improve sequence coverage and resolution in hydrogen/deuterium exchange of large proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2003;17(21):2387-2393. doi:10.1002/rcm.1207
19. Wang L, Pan H, Smith DL. Hydrogen exchange-mass spectrometry: optimization of digestion conditions. *Mol Cell Proteomics*. 2002;1(2):132-138. doi:10.1074/mcp.M100009-MCP200
20. HDX_workflow.png (PNG obrázek, 2460 × 1341 bodů) - Měřítko (48 %). Accessed February 23, 2020. http://peterslab.org/images/HDX_workflow.png
21. Riordan JF, Vallee BL. Acetylation. *Methods Enzymol*. 1972;25(C):494-499. doi:10.1016/S0076-6879(72)25045-5
22. Suckau D, Mak M, Przybylski M. Protein surface topology-probing by selective chemical modification and mass spectrometric peptide mapping. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(12):5630-5634. doi:10.1073/pnas.89.12.5630
23. Dickens F. Interaction of halogenacetates and SH compounds: The reaction of halogenacetic acids with glutathione and cysteine. The mechanism of iodoacetate poisoning of glyoxalase. *Biochem J*. 1933;27(4):1141-1151. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1253000&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
24. Anson ML. the Reactions of Iodine and Iodoacetamide With Native Egg Albumin. *J Gen Physiol*. 1940;23(3):321-331. doi:10.1085/jgp.23.3.321
25. Hustoft H, Malerod H, Wilson S, Reubsaet L, Lundanes E, Greibrokk T. A Critical Review of Trypsin Digestion for LC-MS Based Proteomics. In: ; 2012. doi:10.13140/2.1.2226.7846
26. Trautz OR, Bachra BN. Oriented precipitation of inorganic crystals in fibrous matrices. *Arch Oral Biol*. 1963;8(5):601-613. doi:10.1016/0003-9969(63)90075-x
27. Cannon JG. Bioconjugate Techniques By Greg T. Hermanson. Academic Press, San Diego, CA. 1996. xxiii + 785 pp. 18 × 26 cm. ISBN 0-12-342335-X. \$99.00. \$49.95 (pbk). *J Med Chem*. 1997;40(4):631. doi:10.1021/jm9608319
28. Anderson GW, Zimmerman JE, Callahan FM. N-Hydroxysuccinimide Esters in Peptide Synthesis. *J Am Chem Soc*. 1963;85(19):3039. doi:10.1021/ja00902a047
29. Hermanson GT. (Strept)avidin–Biotin Systems. In: *Bioconjugate Techniques*. Elsevier; 2013:465-505. doi:10.1016/b978-0-12-382239-0.00011-x
30. Zappacosta F, Ingallinella P, Scaloni A, et al. Surface topology of Minibody by selective chemical modifications and mass spectrometry. *Protein Sci*.

- 1997;6(9):1901-1909. doi:10.1002/pro.5560060911
31. Shadmehr M. Design and Synthesis of Triazabutadiene-based Fluorogenic Probes for Tyrosine Specific Labeling of Proteins. Published online January 10, 2019. doi:10.13140/RG.2.2.29711.23209
 32. Riordan JF, Sokolovsky M, Vallee BL. Tetranitromethane. A Reagent for the Nitration of Tyrosine and Tyrosyl Residues of Proteins. *J Am Chem Soc.* 1966;88(17):4104-4105. doi:10.1021/ja00969a046
 33. Miyagi M, Sakaguchi H, Darrow RM, et al. Evidence that light modulates protein nitration in rat retina. *Mol Cell Proteomics.* 2002;1(4):293-303. doi:10.1074/mcp.M100034-MCP200
 34. Patthy L, Smith EL. Reversible modification of arginine residues. Application to sequence studies by restriction of tryptic hydrolysis to lysine residues. *J Biol Chem.* 1975;250(2):557-564.
 35. Antonovič L, Hodek P, Smrček S, Novák P, Šulc M, Strobel HW. Heterobifunctional photoaffinity probes for cytochrome P450 2B. *Arch Biochem Biophys.* 1999;370(2):208-215. doi:10.1006/abbi.1999.1408
 36. Hoare DG, Koshland DE. A Procedure for the Selective Modification of Carboxyl Groups in Proteins. *J Am Chem Soc.* 1966;88(9):2057-2058. doi:10.1021/ja00961a045
 37. Kaur P, Tomechko S, Kiselar J, et al. Characterizing monoclonal antibody structure by carbodiimide/GEE footprinting. *MAbs.* 2014;6(6):1486-1499. doi:10.4161/19420862.2014.975096
 38. Maleknia SD, Brenowitz M, Chance MR. Millisecond radiolytic modification of peptides by synchrotron X-rays identified by mass spectrometry. *Anal Chem.* 1999;71(18):3965-3973. doi:10.1021/ac990500e
 39. Gau BC, Sharp JS, Rempel DL, Gross ML. Fast photochemical oxidation of protein footprints faster than protein unfolding. *Anal Chem.* 2009;81(16):6563-6571. doi:10.1021/ac901054w
 40. Sharp JS, Becker JM, Hettich RL. Analysis of Protein Solvent Accessible Surfaces by Photochemical Oxidation and Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 2004;76(3):672-683. doi:10.1021/ac0302004
 41. Naganathan AN, Muñoz V. Scaling of folding times with protein size. *J Am Chem Soc.* 2005;127(2):480-481. doi:10.1021/ja044449u
 42. Maleknia SD, Wong JW, Downard KM. Photochemical and electrophysical production of radicals on millisecond timescales to probe the structure, dynamics and interactions of proteins. *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3(8):741-748. doi:10.1039/b315904c
 43. Hambly DM, Gross ML. Laser flash photolysis of hydrogen peroxide to oxidize protein solvent-accessible residues on the microsecond timescale. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2005;16(12):2057-2063. doi:10.1016/j.jasms.2005.09.008
 44. Aye TT, Low TY, Sze SK. Nanosecond laser-induced photochemical oxidation method for protein surface mapping with mass spectrometry. *Anal Chem.*

- 2005;77(18):5814-5822. doi:10.1021/ac050353m
45. Li KS, Shi L, Gross ML. Mass Spectrometry-Based Fast Photochemical Oxidation of Proteins (FPOP) for Higher Order Structure Characterization. *Acc Chem Res.* 2018;51(3):736-744. doi:10.1021/acs.accounts.7b00593
 46. Vahidi S, Stocks BB, Liaghati-Mobarhan Y, Konermann L. Mapping pH-induced protein structural changes under equilibrium conditions by pulsed oxidative labeling and mass spectrometry. *Anal Chem.* 2012;84(21):9124-9130. doi:10.1021/ac302393g
 47. Basting D, Marowsky G. Introductory. *Excimer Laser Technol.* Published online 2005:1-7. doi:10.1007/3-540-26667-4_1
 48. Zhang MM, Rempel DL, Gross ML. A Fast Photochemical Oxidation of Proteins (FPOP) platform for free-radical reactions: the carbonate radical anion with peptides and proteins. *Free Radic Biol Med.* 2019;131:126-132. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.11.031
 49. Gau BC, Chen H, Zhang Y, Gross ML. Sulfate radical anion as a new reagent for fast photochemical oxidation of proteins. *Anal Chem.* 2010;82(18):7821-7827. doi:10.1021/ac101760y
 50. Zhang B, Rempel DL, Gross ML. Protein Footprinting by Carbenes on a Fast Photochemical Oxidation of Proteins (FPOP) Platform. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2016;27(3):552-555. doi:10.1007/s13361-015-1313-9
 51. Zhang MM, Rempel DL, Gross ML. A Fast Photochemical Oxidation of Proteins (FPOP) platform for free-radical reactions: the carbonate radical anion with peptides and proteins. *Free Radic Biol Med.* 2019;131(November 2018):126-132. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.11.031
 52. Haberkorn U, Markert A, Eisenhut M, Mier W, Altmann A. Development of molecular techniques for imaging and treatment of tumors. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* 2011;55(6):655-670. Accessed February 28, 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22231585>
 53. Chen J, Cui W, Giblin D, Gross ML. New protein footprinting: Fast photochemical iodination combined with top-down and bottom-up mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2012;23(8):1306-1318. doi:10.1007/s13361-012-0403-1
 54. Cheng M, Zhang B, Cui W, Gross ML. Laser-Initiated Radical Trifluoromethylation of Peptides and Proteins: Application to Mass-Spectrometry-Based Protein Footprinting. *Angew Chemie - Int Ed.* 2017;56(45):14007-14010. doi:10.1002/anie.201706697
 55. Fujiwara Y, Dixon JA, O'hara F, et al. Practical and innate carbon hydrogen functionalization of heterocycles. *Nature.* 2012;492(7427):95-99. doi:10.1038/nature11680
 56. Imiolek M, Karunanithy G, Ng WL, Baldwin AJ, Gouverneur V, Davis BG. Selective radical trifluoromethylation of native residues in proteins. *J Am Chem Soc.* 2018;140(5):1568-1571. doi:10.1021/jacs.7b10230
 57. Eisenberger P, Gischig S, Togni A. Novel 10-I-3 hypervalent iodine-based compounds for electrophilic trifluoromethylation. *Chem - A Eur J.* 2006;12(9):2579-

2586. doi:10.1002/chem.200501052
58. Charpentier J, Früh N, Togni A. Electrophilic trifluoromethylation by use of hypervalent iodine reagents. *Chem Rev.* 2015;115(2):650-682. doi:10.1021/cr500223h
59. Matoušek V, Pietrasiak E, Schwenk R, Togni A. One-pot synthesis of hypervalent iodine reagents for electrophilic trifluoromethylation. *J Org Chem.* 2013;78(13):6763-6768. doi:10.1021/jo400774u
60. Fenn JB. Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture). In: *Angewandte Chemie - International Edition.* Vol 42. ; 2003:3871-3894. doi:10.1002/anie.200300605
61. Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* 1988;60(20):2299-2301. doi:10.1021/ac00171a028
62. Erni F. Liquid chromatography mass spectrometry in the pharmaceutical industry: Objectives and needs. *J Chromatogr A.* 1982;251(2):141-151. doi:10.1016/S0021-9673(00)98513-3
63. Gelpi E. Biomedical and biochemical applications of liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1995;703(1-2):59-80. doi:10.1016/0021-9673(94)01287-O
64. Olsen J V., Ong SE, Mann M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol Cell Proteomics.* 2004;3(6):608-614. doi:10.1074/mcp.T400003-MCP200
65. Gillet LC, Leitner A, Aebersold R. Mass Spectrometry Applied to Bottom-Up Proteomics: Entering the High-Throughput Era for Hypothesis Testing. *Annu Rev Anal Chem.* 2016;9(1):449-472. doi:10.1146/annurev-anchem-071015-041535
66. Gregorich ZR, Chang YH, Ge Y. Proteomics in heart failure: Top-down or bottom-up? *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2014;466(6):1199-1209. doi:10.1007/s00424-014-1471-9
67. Palzs B, Suhail S. Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass Spectrom Rev.* 2005;24(4):508-548. doi:10.1002/mas.20024
68. James P. Mass Spectrometry and the Proteome. In: ; 2001:1-9. doi:10.1007/978-3-642-56895-4_1
69. Shaw JB, Li W, Holden DD, et al. Complete protein characterization using top-down mass spectrometry and ultraviolet photodissociation. *J Am Chem Soc.* 2013;135(34):12646-12651. doi:10.1021/ja4029654
70. Little DP, Speir JP, Senko MW, O'Connor PB, McLafferty FW. Infrared Multiphoton Dissociation of Large Multiply Charged Ions for Biomolecule Sequencing. *Anal Chem.* 1994;66(18):2809-2815. doi:10.1021/ac00090a004
71. Gregorich ZR, Chang YH, Ge Y. Proteomics in heart failure: Top-down or bottom-up? *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2014;466(6):1199-1209. doi:10.1007/s00424-014-1471-9
72. Syka JEP, Coon JJ, Schroeder MJ, Shabanowitz J, Hunt DF. Peptide and protein

- sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(26):9528-9533. doi:10.1073/pnas.0402700101
73. Zubarev RA, Zubarev AR, Savitski MM. Electron Capture/Transfer versus Collisionally Activated/Induced Dissociations: Solo or Duet? *J Am Soc Mass Spectrom*. 2008;19(6):753-761. doi:10.1016/j.jasms.2008.03.007
74. Zubarev RA, Kelleher NL, McLafferty FW. Electron Capture Dissociation of Multiply Charged Protein Cations. A Nonergodic Process. *J Am Chem Soc*. 1998;120(13):3265-3266. doi:10.1021/ja973478k
75. Young MM, Tang N, Hempel JC, et al. High throughput protein fold identification by using experimental constraints derived from intramolecular cross-links and mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(11):5802-5806. doi:10.1073/pnas.090099097
76. Vijay-kumar S, Bugg CE, Cook WJ. Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol*. 1987;194(3):531-544. doi:10.1016/0022-2836(87)90679-6
77. Maurus R, Overall CM, Bogumil R, et al. A myoglobin variant with a polar substitution in a conserved hydrophobic cluster in the heme binding pocket. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol*. 1997;1341(1):1-13. doi:10.1016/S0167-4838(97)00064-2
78. Rahimidashaghoul K, Klimánková I, Hubálek M, et al. Reductant-Induced Free Radical Fluoroalkylation of Nitrogen Heterocycles and Innate Aromatic Amino Acid Residues in Peptides and Proteins. *Chem - A Eur J*. 2019;25(69):15779-15785. doi:10.1002/chem.201902944
79. Novak P, Kruppa GH, Young MM, Schoeniger J. A top-down method for the determination of residue-specific solvent accessibility in proteins. *J Mass Spectrom*. 2004;39(3):322-328. doi:10.1002/jms.587

9 Přílohy